

09/700879
PCT/JP99/02600

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

19.05.99

コマ99/1600

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 2月22日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第043064号

出願人
Applicant(s):

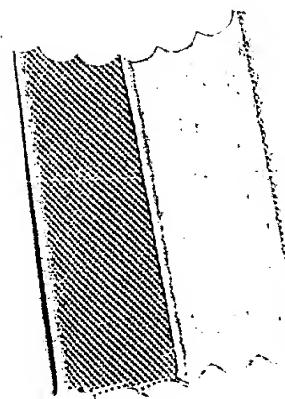
中外製薬株式会社

REC'D 09 JUL 1999
WIPO PCT

PRIORITY
DOCUMENT

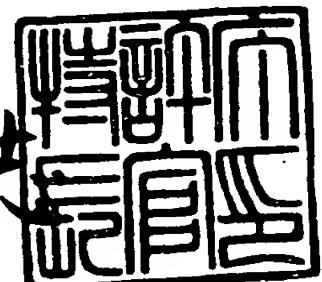
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日



特許庁長官
Commissioner
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3041209

【書類名】 特許願
【整理番号】 990298
【提出日】 平成11年 2月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C08B
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】 田村 達也
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】 岡町 晃
【特許出願人】
【識別番号】 000003311
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100089705
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2
06区 ユアサハラ法律特許事務所
【弁理士】
【氏名又は名称】 杜本 一夫
【電話番号】 03-3270-6641
【選任した代理人】
【識別番号】 100071124
【弁理士】
【氏名又は名称】 今井 庄亮
【選任した代理人】
【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100104477

【弁理士】

【氏名又は名称】 藍原 誠

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705604

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 関節疾患治療薬とヒアルロン酸との結合体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 1種以上の関節疾患治療薬と (2) ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体。

【請求項2】 結合が共有結合である、請求項1記載の結合体。

【請求項3】 関節疾患治療薬がマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である、請求項1又は2に記載の結合体。

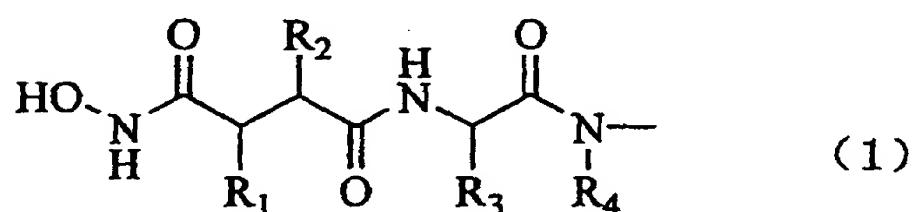
【請求項4】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤がスペーサーを介してヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合している請求項1から3の何れか1項記載の結合体。

【請求項5】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の重量割合が、結合体全体に対して0.01～50%である、請求項1から4の何れか1項記載の結合体。

【請求項6】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤がヒドロキサム酸残基である、請求項1から5の何れか1項に記載の結合体。

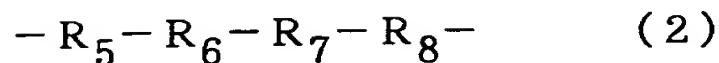
【請求項7】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤が、一般式(1)：

【化1】



[式中、R₁は、水素原子、水酸基、又は炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₂は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₃は、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₄は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。] で表されるヒドロキサム酸残基である、請求項1から6の何れか1項に記載の結合体。

【請求項8】 スペーサーが、一般式（2）：

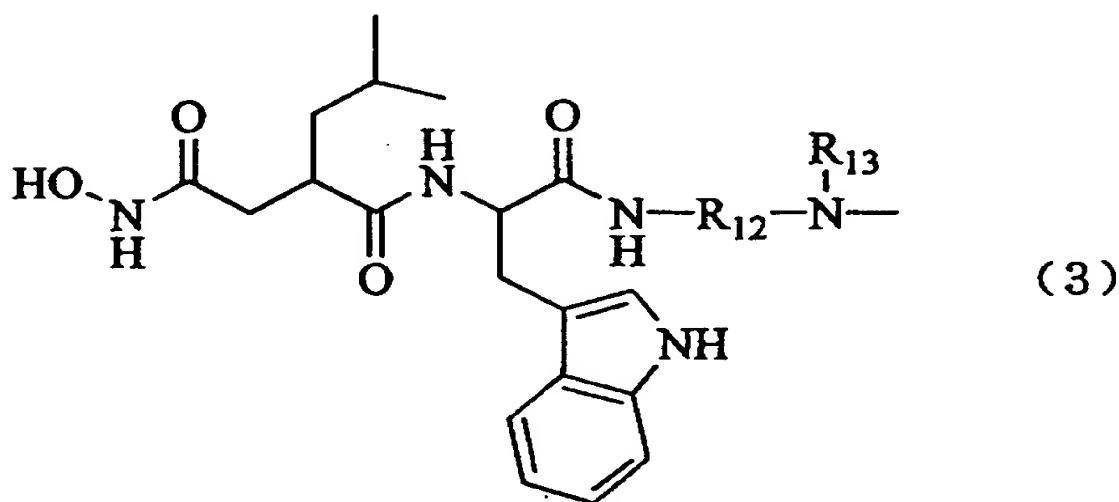


[式中、 R_5 は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_6 は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し； R_7 は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_8 は、酸素原子、硫黄原子、又は NR_9 （ここで、 R_9 は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す）を表す。]

で表される、請求項1から7のいずれか1項に記載の結合体。

【請求項9】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤とスペーサーとの結合体が、一般式（3）：

【化2】



[式中、 R_{12} は、1個のイミノ基および／又は1～4個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数2～23の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_{13} は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

で表される、請求項1～8のいずれか1項に記載の結合体。

【請求項10】 生体内においてマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤がヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合した状態でマトリックスメタロプロテアーゼを阻害する、請求項1から9の何れか1項に記載の結合

体。

【請求項11】 関節疾患治療薬中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって又はスペーサーを介して結合させることを含む、請求項1から10の何れか1項に記載の結合体の製造方法。

【請求項12】 請求項1か10の何れか1項に記載の結合体を含む医薬。

【請求項13】 関節疾患治療薬である、請求項12に記載の医薬。

【請求項14】 関節疾患が変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎である、請求項13に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、関節疾患治療薬を結合させたヒアルロン酸又はその誘導体又はそれらの塩に関する。さらに詳細には、本発明は、変形性関節症、慢性関節リウマチ等の治療に有効な、関節疾患治療薬と、ヒアルロン酸又はその誘導体又はそれらの塩とを化学的に結合させた結合体、その製造方法並びに上記結合体を含む医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

関節軟骨は約70%の水分と、軟骨細胞および軟骨マトリックスとから構成されている。軟骨マトリックスを構成する主成分はコラーゲンとプロテオグリカンであり、網目構造を有するコラーゲンのネットワークに水分保持能に富むプロテオグリカンが含有されている。軟骨マトリックスは粘弾性に富み、軟骨にかかる刺激や負荷を軽減して、関節軟骨が正常な形態と機能を保持する上で重要な役割を果たしている。

【0003】

変形性関節症(以下、OAとも称す)と慢性関節リウマチ(以下、RAとも称す)は、共に軟骨マトリックスの破壊を伴う代表的な疾患である。両疾患におけるマトリックスの破壊は、OAでは加齢に伴うメカニカルストレス、RAでは滑膜表

層細胞の過剰増殖、パンヌス形成、炎症性細胞の浸潤などが引き金となり、いずれもプロテアーゼの誘導を介して惹起されると考えられている。軟骨マトリックスの分解は中性のpHを持つ細胞外で行われることから、この領域のpHを至適とするマトリックスメタロプロテアーゼ（以下、MMPとも称す。総称として用いる時にはMMPsとも称す）が分解の中心的な担い手と言われている。

【0004】

現在までに、MMPファミリーに属するものとして、ヒトでは16種類のプロテアーゼが報告されており、それらと結合して活性を阻害する組織メタロプロテアーゼインヒビター（以下、TIMPとも称す。総称として用いる時は、TIMPsとも称す）と呼ばれる生体内タンパク質も4種類が見いだされている。MMPsは生理的条件下では発生、血管新生、性周期、骨リモデリング、組織修復などさまざまな機能を担っている。これらの機能が適切に発現されるよう、MMPsの産生、活性化および基質との相互作用の各段階はTIMPs等によって厳密にコントロールされている。換言すれば、病態でのマトリックスの破壊は、MMPsの調節機構に何らかの破綻が生じ、MMPsが過剰に産生、活性化されたことに起因すると考えられる。

【0005】

それゆえ、MMPsを阻害する薬物は、OAやRA等の関節疾患における軟骨マトリックスの破壊を抑制する薬物として極めて有望である。MMPsを阻害する薬物はこれまでにも数多く報告されているが、阻害活性の強さとMMPsへの特異性の高さからヒドロキサム酸であるMMP阻害剤が、現在、最も注目されている。既に経口投与でもMMP阻害作用を発揮するヒドロキサム酸が見いだされており、そのうちのいくつかは癌患者や関節炎患者を対象に、臨床試験が開始されている。

【0006】

しかし、この種のMMP阻害剤は、程度の差こそあれ、すべてのMMPsに対する阻害作用を持ち、生理的な機能に関わるMMPsをも抑制してしまうという重大な欠点がある。事実、癌患者を対象に進行中のヒドロキサム酸の臨床試験では、一過性ながら骨筋肉痛などの副作用が報告されている。最近では、特定のM

MMPsへの特異性を高めた改良品の開発も進められているが、未だ病態のみに関与するMMPsは見いだされていない。また、続々と新規なMMPsが発見されていることから、全身投与時にはMMPsの何らかの生理作用を抑制してしまう可能性が依然として残る。

【0007】

上記問題点を解消する試みとしては、第1に、ヒドロキサム酸の関節腔内への局所投与が考えられる。しかし、ヒドロキサム酸の局所濃度を維持するためには、頻回の投与が必要となり、長期の投与を余儀なくされるOAやRAの患者では、極めて困難である。他の試みとしては、ヒドロキサム酸を標的部位にのみ限定的に局在させる、いわゆるドラッグデリバリーシステムの使用が考えられる。しかし、従来技術では投与されたヒドロキサム酸を罹患関節内に限定的に局在または貯留させる方法は確立されていない。

このように、ヒドロキサム酸は優れた薬理作用を有しながらも、OAやRAのような慢性疾患の治療薬として臨床応用するためには、依然として解決すべき問題点が存在する。

【0008】

一方、現在、関節疾患、特にOAや肩関節周囲炎においては、ヒアルロン酸（以下、HAとも称す）及びその架橋物（以下、ヒアルロン酸とその架橋物を総称してHA製剤とも称す）の関節内注入療法が臨床的に広く行われている。

【0009】

ヒアルロン酸（HA）は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸との繰り返し単位より構成される生体内多糖であり、関節液を構成する主成分として関節液の粘弹性、荷重吸収作用および潤滑作用の保持に重要な働きを果たしている。また、HAは、軟骨マトリックスにおいて、軟骨プロテオグリカンと結合して、アグリカンと呼ばれる重合体を形成し、軟骨基質の水分保持能と粘弹性を維持する中心的な役割を担っている。

【0010】

一般に、HA製剤は、MMPsを阻害する作用はないものの、潤滑剤として、更には関節でのHA産生を促進するなどにより、関節機能の障害を緩和する作用

を有すると言われている。HAは元々、細胞外マトリックスの構成成分でもあることから細胞外マトリックスに高い親和性を有し、またそれ自身高い粘弾性を有することから、関節内に注入された後、関節腔内に長時間局在する特徴を有している。実際、¹⁴C標識HAを用いた実験では、ウサギ膝関節腔内に投与された¹⁴C標識HAは、関節液、滑膜組織、関節軟骨の表層などに分布し、それらの組織から消失するのに3日間以上を要すると報告されている。また、HAは関節液中では分解を受けず、滑膜組織や関節軟骨では一部が分解されるものの、大半は徐々に滑膜を介して血中に移行し、肝臓にて低分子化を受けると言われている。

【0011】

また、HA製剤に何らかの薬物を結合させた後、生体内に投与すれば、その薬物はHA製剤と共に特定部位に長時間貯留し、薬物単独を投与した場合に比べ、特定部位での薬物の作用時間は、大幅に延長することが期待される。また、こうした効果により、薬物の投与量、投与回数は従来の投与方法に比べ著しく低減でき、結果的に副作用を大幅に軽減させることが可能となることが期待される。

【0012】

HAと薬物との結合体としては、これまでに、特開平5-85942号公報記載のインターフェロン-ヒアルロン酸結合体、WO92/06714号公報記載のヒアルロン酸-抗癌剤結合物質、特開昭62-64802号公報記載のヒアルロン酸-コルチコステロイド結合体、及び特許第2701865号公報記載のヒアルロン酸-抗生物質共役結合体等が知られている。

【0013】

しかし、これらの例では殆どの場合、HAが低分子化を受けるか、HAと薬物の結合が加水分解を受けるなどして薬物が遊離し、その薬物が標的細胞または組織に取り込まれてはじめて薬効が発現する。従って、HAがほとんど分解を受けない関節腔内などでは、薬物がHAと結合した状態でも薬効を発現しうる結合体を開発することが重要である。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的の一つは、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテ

アーゼ阻害剤、特にヒドロキサム酸を関節腔内に貯留させることのできるマトリックスマタロプロテアーゼ阻害剤；あるいはその他の非ステロイド抗炎症薬、シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬、疾患修飾性抗リウマチ薬またはステロイド薬）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体を提供することである。

本発明の別の目的は、上記結合体の製造方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、上記結合体を含む医薬を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、MMP阻害作用を有するヒドロキサム酸が人工的な多糖の一種であるアガロースにカップリングした場合でも、MMPsへの結合能を保持していることを証明した例があること、並びに、これまで発見された全てのMMPsが細胞外あるいは細胞表層で機能を発現する酵素であることに着目し、上記課題を解決するために銳意検討した結果、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤、あるいはその他の非ステロイド抗炎症薬、シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬、疾患修飾性抗リウマチ薬またはステロイド薬）をHA又はHA誘導体又はそれらの塩に化学的に結合させることによって作製される結合体、例えばヒドロキサム酸とHA製剤との共有結合体は、両者が結合したままの状態でもMMP阻害作用を発現しうる可能性があることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0016】

さらにまた、関節腔内に投与された関節疾患治療薬とHA又はHA誘導体又はそれらの塩との結合物は、HA製剤同様、関節腔内に長期間貯留し、MMP阻害剤に伴う全身性の副作用を軽減すると共に、関節疾患治療薬としてのHAの薬効を保持しうること、すなわち、局所において両者相俟った相乗的な薬効が期待でき、生物学的有用性が改善された薬剤となりうることを見いだし、本発明を完成するに至った。

【0017】

即ち、本発明の第1の側面によれば、（1）1種以上の関節疾患治療薬と（2）ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体が提供される

【0018】

本発明の一態様では、関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合は共有結合である。

本発明の一態様では、関節疾患治療薬はマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である。

【0019】

本発明の一態様では、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はスペーサーを介してヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合している。

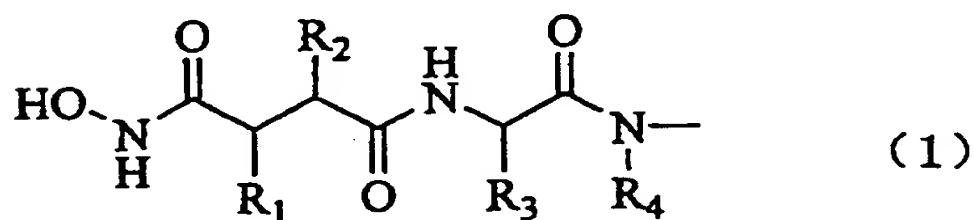
本発明の結合体において、結合体全体に対するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の重量割合には特に制限はないが、好ましくは0.01～50%、特に好ましくは0.1～10%である。

【0020】

本発明の結合体において好ましくは、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はヒドロキサム酸残基である。

マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤は特に好ましくは、一般式(1)：

【化3】



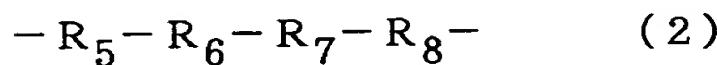
[式中、R₁は、水素原子、水酸基、又は炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₂は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₃は、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されていてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₄は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]で表されるヒドロキサム酸残基である。

【0021】

本発明の結合体においては、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤とヒアル

ロン酸成分との間にスペーサーが存在する場合、スペーサーは特に好ましくは、

一般式(2)：



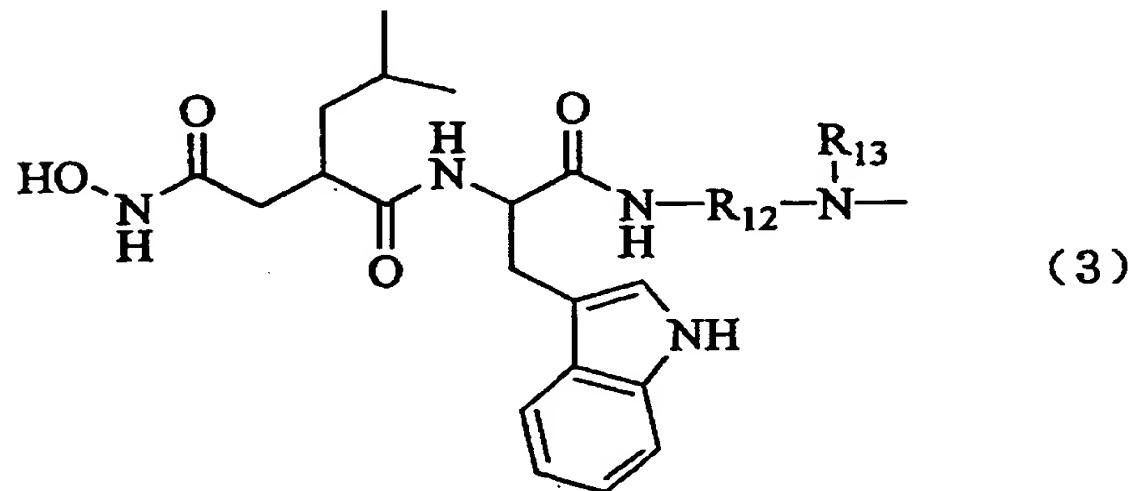
[式中、 R_5 は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_6 は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し； R_7 は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_8 は、酸素原子、硫黄原子、又は $N R_9$ （ここで、 R_9 は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す）を表す。]

で表される。

【0022】

本発明の結合体において、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤とスペーサーとの結合体の特に好ましい具体例は、一般式(3)：

【化4】



[式中、 R_{12} は、1個のイミノ基および／又は1～4個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数2～23の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_{13} は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

で表される。

【0023】

また本発明の結合体を生体に投与した場合、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合した状態でマトリックスメタロプロテアーゼを阻害することができる。

【0024】

本発明の第2の側面によれば、関節疾患治療薬中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって又はスペーサーを介して結合させることを含む、本発明の結合体の製造方法が提供される。即ち、上記の製造方法においては、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって結合させること、あるいは、結合反応を行う時、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）とスペーサーの先端にある反応点との間に空間が生じるため、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）の立体的影響を受けることなくHA又はHA誘導体又はそれらの塩と反応すること、及び／又は、結合体において、HA又はHA誘導体又はそれらの塩と関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）との間に空間が生じるため、MMPがHA又はHA誘導体又はそれらの塩の立体的影響を受けることなく関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）に近づくこと、すなわち、MMP阻害活性が結合した状態でも維持されること等を期待して、スペーサーを介して結合させることが含まれる。

【0025】

本発明の第3の側面によれば、本発明の結合体を含む医薬が提供される。

本発明の医薬は、特に関節疾患の治療薬、さらに具体的には変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎の治療薬である。

【0026】

【発明の実施の形態】

本発明において、関節治療薬としては、例えば：

- (1) サリチル酸系非ステロイド抗炎症薬（ザザピリン、アスピリン、ジフルニサル、サリチルアミド等が挙げられる）、フェナム酸系非ステロイド抗炎症薬

(フルフェナム酸、フルフェナム酸アルミニウム、メフェナム酸、フロクタフェニン、トルフェナム酸等が挙げられる)、アリール酢酸系非ステロイド抗炎症薬(ジクロフェナクナトリウム、トルメチンナトリウム、スリンダク、フェンブフェン、インドメタシン、インドメタシンファルネシル、アセメタシン、マレイン酸プログルメタシン、アンフェナクナトリウム、ナブメトン、モフェゾラク、エトドラク、アルクロフェナク等が挙げられる)、プロピオン酸系非ステロイド抗炎症薬(イブプロフェン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、プラノプロフェン、フェノプロフェンカルシウム、チアプロフェン酸、オキサプロジン、ロキソプロフェンナトリウム、アルミノプロフェン、ザルトプロフェン、チアプロフェン酸等が挙げられる)、ピラゾロン系非ステロイド抗炎症薬(ケトフェニルブタゾン等が挙げられる)、オキシカム系非ステロイド抗炎症薬(ピロキシカム、テノキシカム、アンピロキシカム等が挙げられる)、塩基性非ステロイド抗炎症薬(塩酸チアラミド、塩酸チノリジン、塩酸ベンジダミン、エピリゾール、エモルファゾン等が挙げられる)などの非ステロイド抗炎症薬;

(2) シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬(セレコキシブ(celecoxib) : サル、MK-966 : メルク、JTE522 : 日本たばこ等が挙げられる)；

(3) ペニシラミン、ロベンザリットニナトリウム、オーラノフィン、ブシラミン、アクタリット、サラゾスルファピリジン、金チオリンゴ酸ナトリウム、クロロキン、TNF α 受容体製剤(例えばEnbrel(登録商標) : アメリカン・ホーム・プロダクツ)、ミゾリビン、シクロスボリン、メトトレキセート、leflunomide : ヘキスト マリオン ルセル、アザチオプリン、FK-506 : 藤沢薬品、VX-497 : Vertex、TAK-603 : 武田薬品工業、抗TNF α 抗体(例えばinfliximab : Centocor、D2E7 : Knoll)、抗IL-6受容体抗体(例えば、MRA : 中外製薬)、T-614 : 富山化学、KE-298、大正製薬、mycophenolate mofetil : Roche、thalidomide : Celgen、抗CD4抗体、IL-1受容体アンタゴニスト、抗CD52抗体、p38MAKPキナーゼ阻害薬、ICE阻害薬、TACE阻害薬などの抗リウマチ薬；

(4) ステロイド薬(酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、パルミチン酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、酢酸パラメタゾン、

酢酸ハロプレドン、ファルネシル酸プレドニゾロン、酢酸テトラコサクチド等が挙げられる) ;

(5) 塩酸プロカイン、塩酸テトラカイン、塩酸リドカインなどの局所麻酔薬 ; 並びに

(6) マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤などの軟骨保護薬 ;
が挙げられるが、好ましくはマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。

【0027】

本発明において、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害剤とは、任意の生体 (好ましくは哺乳類、特に好ましくはヒト) 由来の任意のマトリックスメタロプロテアーゼの活性を、例えばそれに結合すること等により、阻害することができる全ての物質を意味する。

【0028】

より具体的には、MMP阻害剤とは、カルボン酸、リン酸、チオール、ヒドロキサム酸等の官能基を介してMMPの活性中心の亜鉛に結合することで酵素阻害活性を発揮する化合物またはタンパク質 (ポリペプチドを含む) を意味し、また、MMPsあるいは、分子中にディスインテグリンとMMP様のドメインを併せ持つタンパク分解酵素 (例えば、TNF α 変換酵素、あるいはディスインテグリン-メタロプロテアーゼファミリー (ADAM) に属する一群のプロテアーゼ) の酵素活性の発現を阻害するものを意味する。これらのMMP阻害剤は、その阻害活性として、S.C.Cruwysらの方法 (Br. J. Pharmacol, 100, 631-635(1990)に記載) による軟骨細胞や滑膜細胞によって惹起されるコラーゲンの分解、あるいは、M.DiMartinoらの方法 (Inflamm. Res., 46, 211-215(1997)に記載) によるヒト末梢白血球から遊離されるTNF α の遊離に対して、10mg/ml以下のいずれかの濃度で50%以上の抑制を示すことを特徴とする。さらに、その構造式中に化学修飾を施しても、上記2種類の阻害活性のいずれかが、10mg/ml以下のいずれかの濃度で45%以上の抑制を示していれば、そのような化学修飾された阻害剤も含まれる。

【0029】

MMP阻害剤の非限定的具体例としては、テトラサイクリン系化合物（テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、及びテトラサイクリンの化学修飾体（例えばCMT1～4；コラゲネックス）等が挙げられる）、TIMPs修飾体（例えばCMT1～4；コラゲネックス）等が挙げられる）、TIMPs、及びヒドロキサム酸等が挙げられ、MMP阻害活性の強さとMMPsへの特異性の高さの点から、好ましくはヒドロキサム酸が挙げられる。

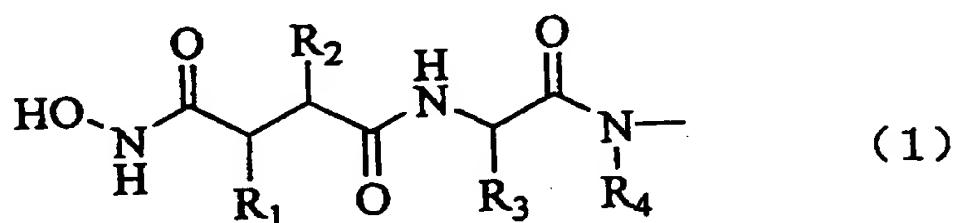
このようなMMP阻害剤の例は、例えば、特公平9-80825号公報、特許第2736285号公報、及びドラッグ・ディスカバリー・トウディ、第1巻、16～26頁（1996年）等に記載されている。

【0030】

ヒドロキサム酸とは、N-ヒドロキシアミド基を有する化合物を意味し、非限定的具体例としては、AG-3340（アグロン（Aguron））、CDP-845（ゼネカ）、CGS-27023A（ノバルティス）、D5410（カイロサインス）、L758354（メルク）、CH-138（カイロサイエンス）、マリマstatt（Marimastat、登録商標、ブリティッシュバイオテック）、ガラルディン（Galardin、登録商標、グリコメッド）、R031-9790（ロシュ）及びR032-3555（ロシュ）等が挙げられる。また本発明の結合体中のヒドロキサム酸残基の非限定的具体例としては、

例えば一般式（1）：

【化5】



[式中、R₁は、水素原子、水酸基、又は炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₂は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₃は、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換された基を表し；R₄は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し；R₄は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]で示されるヒドロキサム酸残基が挙げられる。

【0031】

一般式(1)で示されるMMP阻害剤であるヒドロキサム酸残基の定義において、 R_1 の非限定的具体例としては、水素原子、水酸基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基等が挙げられるが、好ましくは水素原子である。

【0032】

R_2 の非限定的具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基等が挙げられるが、好ましくはイソブチル基である。

【0033】

R_3 における、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状アルキル基の炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基中のアルキル基成分の非限定的具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基等が挙げられるが、好ましくは、メチル基、イソブチル基、t-ブチル基である。

【0034】

また、上記アルキル基上に存在していてもよいシクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基の非限定的具体例としては；

炭素数3～10、好ましくは炭素数5～7のシクロアルキル基（例えば、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、又はシクロヘプチル基等）；

水酸基、メトキシ基等の置換基を有していてもよい炭素数6～20、好ましくは炭素数6～14のアリール基（例えば、フェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、又はナフチル基等）；並びに

窒素原子、硫黄原子又は酸素原子の中から選択される同一又は異なる1個以上、好ましくは1から3個、特に好ましくは1個のヘテロ原子を含む、原子数5～

20、好ましくは原子数5～10、特に好ましくは原子数5、6、9又は10の
飽和又は不飽和の複素環（例えば、ピリジル基、キノリル基、又は3-インドリ
ル基等；特に好ましくは3-インドリル基）が挙げられる。

【0035】

代表的には、R₃は、アリール基もしくは複素環基で置換されている炭素数1
～5の直鎖状のアルキル基が好ましく、なかでもベンジル基、p-ヒドロキシベ
ンジル基、3-インドリルメチル基が特に好ましく、3-インドリルメチル基が
最も好ましい。

【0036】

R₄の非限定的具体例としては、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピ
ル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、t-
ブチル基が挙げられるが、好ましくは水素原子である。

【0037】

一般式（1）で示されるヒドロキサム酸残基は1個以上の不斉炭素中心を含む
が、各不斉炭素中心について、その絶対配置がR配置及びS配置のいずれのもの
も、本発明に含まれる。

【0038】

マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の重量割合は、結合体全体に対して好
ましくは0.01～50%であり、特に好ましくは0.1～10%である。
なお、本発明の1種以上の関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘
導体又はそれらの塩との結合体において、好ましい関節疾患治療薬であるMMP
阻害剤は、結合体の合成過程もしくは合成後で、その構造が変化する場合があり
得るが、変化した場合でも、本願明細書に記載した阻害活性（コラーゲン分解抑
制及び/又はTNF α の遊離抑制）を有していれば、本発明に含まれる。

【0039】

本発明において、「ヒアルロン酸（HA）」とは、重量平均分子量100,0
0～10,000,000を有する、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミ
ンとから成る二糖の重合体、並びにこれらの混合物を意味する。ヒアルロン酸は
、粘弾性の強さの点から、重量平均分子量700,000～10,000,00

0を有するヒアルロン酸が好ましく、重量平均分子量1,000,000～10,000,000のヒアルロン酸が特に好ましい。

【0040】

本発明において「ヒアルロン酸誘導体」とは、ヒアルロン酸から誘導されるヒアルロン酸骨格を有する全ての物質を意味する。ヒアルロン酸誘導体の非限定的具体例としては；

- (1) 糖成分であるグルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが還元末端を有しているヒアルロン酸誘導体；
- (2) ヒアルロン酸中の1以上の水酸基がアセチル化されているアセチル化ヒアルロン酸；
- (3) 重量平均分子量100,000～10,000,000を有するグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとからなる二糖の重合体を、ホルムアルデヒドで架橋してさらに高分子化した誘導体（例えば、シンビスク（Synvisc、登録商標、バイオマトリックス）；並びに
- (4) 本明細書中上記したヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体に1以上の薬効成分、例えば制癌剤（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等が挙げられる）、免疫抑制剤、抗炎症剤（ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤等が挙げられる）、抗リウマチ剤、抗菌剤（β-ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、ポリペプチド系抗生物質、サルファ剤等が挙げられる）などを、スペーサーを介して又は介さずに結合させることによって得られる誘導体；

等が挙げられる。

【0041】

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体の塩の非限定的具体例としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩などを挙げることができる。

【0042】

HAの由来には特に制限はないが、例えば、放線菌等のバクテリア、ヒト、ブ

タ、ニワトリ等に由来するHAを使用できる。

【0043】

HA及びそれらの塩の非限定的具体例としては、例えば、スペニール（登録商標、日本ルセル）、アルツ（登録商標、科研製薬）、オペガン（登録商標、参天製薬）、ヒアルガン（登録商標、フィーディア）、オルトビスク（登録商標、アニカセラピューティックス）、ヒアロン（登録商標、ファルマシア&アップジョブ）等を挙げることでき、また、和光純薬工業（株）等の各種試薬メーカーのカタログに記載のHA及びこれらの塩を挙げることもできる。

【0044】

本発明の結合体においては、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とは、スペーサーを介して又は介さずに結合している。関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との間の結合様式としては、スペーサーを介さない場合にはアミド結合、エーテル結合等の結合が挙げられ、あるいはスペーサーを介して結合している。好ましくは、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とは、スペーサーを介して結合している。

【0045】

関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とがスペーサーを介さずに結合している場合、これらの両者はそれらの活性を損なわない部位で結合している。また、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とがスペーサーを介して結合している本発明の好ましい態様においては、スペーサーと関節疾患治療薬、並びにスペーサーとHA又はHA誘導体又はそれらの塩は、関節疾患治療薬及びHA又はHA誘導体又はそれらの塩が、その活性を損なわない部位でスペーサーと、それぞれ結合している。

【0046】

そのような活性を損なわない部位としては、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）においては、例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、及びチオール基等が挙げられる。また、MMP阻害剤である関節疾患治療薬が一般式（1）で表されるヒドロキサム酸残基である本発明の好ましい態様の場合、その末端に位置する1級もしくは2級のアミノ基が挙げられる。HA又はHA誘導体又はそれらの塩においては、例えば、水酸基又はカルボキシル基が挙げられるが、好ましくはカルボキシル基である。

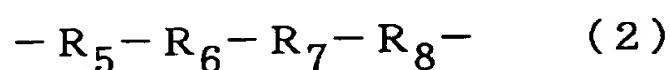
【0047】

関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）とHA又はHA誘導体又はそれらの塩、スペーサーと関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）、並びにスペーサーとHA又はHA誘導体又はそれらの塩との間の結合の種類は特に限定されないが、例えば、アミド結合、エーテル結合、エステル結合、スルフィド結合が挙げられる。

HA又はHA誘導体又はそれらの塩に結合する関節疾患治療薬は1種である必要はなく、2種以上の異なる関節疾患治療薬であってもよい。また、1つの結合体にスペーサーを介した結合部位とスペーサーを介さない結合部位とを有することを妨げない。さらには、1つの結合体中に存在するスペーサーが同一である必要もない。

【0048】

スペーサーの種類は、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）とHA又はHA誘導体又はそれらの塩の活性に重大な影響を及ぼさない限り特に限定されず、その非限定的具体例としては、例えば一般式（2）：



[式中、 R_5 は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_6 は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し； R_7 は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_8 は、酸素原子、硫黄原子、又はNR₉（ここで、R₉は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す）を表す

。】で示されるスペーサーが挙げられる。

上記一般式(2)で示されるスペーサーは、 R_5 —末端で関節疾患治療薬(例えは、MMP阻害剤)と結合し、 R_8 —末端でHA又はHA誘導体又はそれらの塩と結合する。

【0049】

一般式(2)で示されるスペーサーの定義において、 R_5 の非限定的具体例としては、メチレン基、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、2-メチルペンタン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基などが挙げられ、好ましくはエタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基である。

【0050】

R_6 における、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されてもよいメチレン基もしくはイミノ基の、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基等が挙げられる。

【0051】

代表的には R_6 は、炭素数1～3の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されてもよいメチレン基、及び酸素原子が好ましく、メチレン基、及び酸素原子が特に好ましい。

【0052】

R_7 の非限定的具体例としては、メチレン基、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、オクタン-1, 10-ジイル

基、2-メチルペンタン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基、1-オキサープロパン-1, 3-ジイル基、2-オキサブタン-1, 4-ジイル基、3-オキサペンタン-1, 5-ジイル基、2-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、3-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、1, 4-ジオキサヘキサン-1, 6-ジイル基、3-オキサヘプタン-1, 7-ジイル基、2, 5-ジオキサヘプタン-1, 7-ジイル基、4-オキサオクタン-1, 8-ジイル基、2, 6-ジオキサオクタン-1, 8-ジイル基、3, 6-ジオキサ-4-メチルノナン-1, 9-ジイル基、3, 6-ジオキサ-5-エチルノナン-1, 9-ジイル基、1, 4, 7-トリオキサオクタン-1, 10-ジイル基などが挙げられ、好ましくはエタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、3, 6-ジオキサノナン-1, 9-ジイル基などが挙げられる。

【0053】

R_8 の非限定的具体例としては、酸素原子、硫黄原子、イミノ基、メチルイミノ基、エチルイミノ基、n-プロピルイミノ基、i-プロピルイミノ基、n-ブチルイミノ基、sec-ブチルイミノ基、イソブチルイミノ基、t-ブチルイミノ基が挙げられるが、好ましくはイミノ基またはメチルイミノ基などが挙げられ、特に好ましくはイミノ基である。

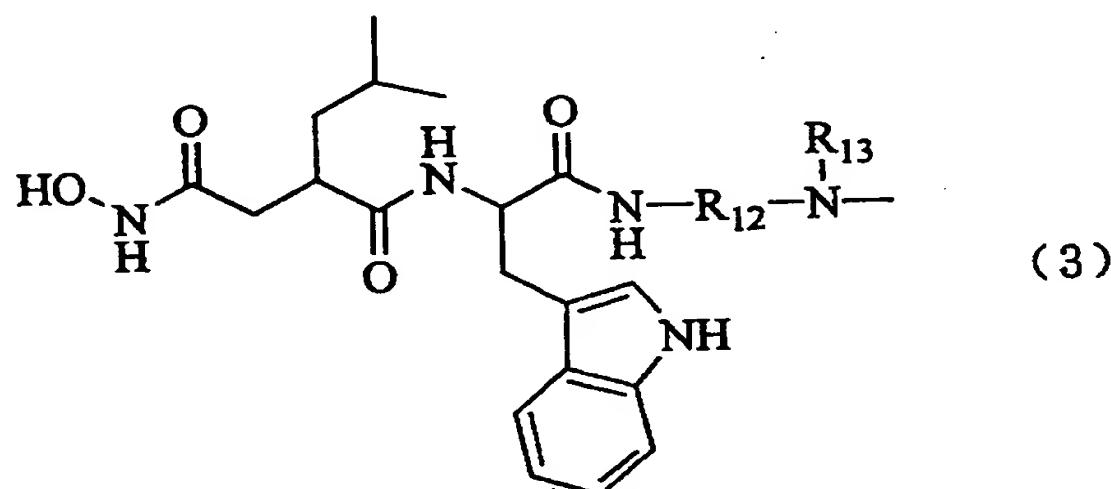
【0054】

一般式(2)で示されるスペーサーの好ましい具体例としては、 $-(CH_2)_4-NH-$ 、 $-(CH_2)_5-NH-$ 、 $-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_7-NH-$ 、 $-(CH_2)_8-NH-$ 、 $-(CH_2)_9-NH-$ 、 $-(CH_2)_{10}-NH-$ 、 $-(CH_2)_{11}-NH-$ 、 $-(CH_2)_{12}-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_3-NH-$ 、 $-(CH_2)_4-O-(CH_2)_4-NH-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-NH-$ 等が挙げられる。

【0055】

さらに、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とがスペーサーを介して結合している結合体において、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とスペーサーとの結合体の好ましい非限定的具体例としては、一般式（3）：

【化6】



[式中、 R_{12} は、1個のイミノ基および／又は1～4個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数2～23の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； R_{13} は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

】

で示される結合体を挙げることができる。

【0056】

一般式（3）で示される結合体のうち、ヒドロキサム酸残基部分は、一般式（1）で示される好ましい MMP 阻害剤の例と同一である。

また、 R_{12} の非限定的具体例としては、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、デカン-1, 10-ジイル基、ウンデカン-1, 11-ジイル基、ドデカン-1, 12-ジイル基、2-メチルペンタン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチルタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチル

ペンタン-1, 5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-O-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ などが挙げられ、好ましくはブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、デカン-1, 10-ジイル基、ウンデカン-1, 11-ジイル基、ドデカン-1, 12-ジイル基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-O-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ などが挙げられる。R₁₃の非限定的具体例としては、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基などが挙げられるが、好ましくは水素原子及びメチル基などが挙げられ、特に好ましくは水素原子が挙げられる。

【0057】

本発明の、一般式(2)で表されるスペーサー、及び一般式(3)で表される結合体は、分子内に不斉炭素原子を有する場合があり、その絶対配置がR配置、S配置である立体異性体が存在する場合があるが、その各々、あるいはそれらの任意の割合の構造単位(スペーサー及び結合体)のいずれも本発明に包含される。

【0058】

本発明の結合体の製造方法としては、例えば、関節疾患治療薬(例えば、MMP阻害剤)中の活性に影響を及ぼさない部位(例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、及びチオール基等が挙げられる)と、HA又はHA誘導体又はこれらの塩のカルボキシル基、水酸基、又は還元末端由来のアルデヒド基とを、化学反応によって結合させる方法が挙げられる。これらは、既知の手法(新生化学実験講座第1巻タンパク質I(東京化学同人)、蛋白質・酵素の基礎実験法(南江堂)などに記載)で行うことができる。

具体的には、

(1) 脱水縮合剤を用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中のカルボキシル基を活性化し、アミド結合、エステル結合またはチオエステル結合を形成させる方法；

(2) 関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中の水酸基を臭化シアンを用いて活性化した後、HA又はHA誘導体又はそれらの塩中のアミノ基と結合させて活性化した後、HA又はHA誘導体又はそれらの塩中の水酸基を臭化シアンを用いて方法、及びHA又はHA誘導体又はそれらの塩中のアミノ基と結合させ活性化した後、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミノ基と結合させる方法；

(3) エピクロルヒドリン等のエピハロヒドリンもしくは1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテル等のジエポキシド、あるいは、トシリクロリドやトレシリルクロリド等のスルホニルクロリドを用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中の水酸基を活性化し、エーテル結合やイミノ結合またはスルフィド結合を形成させる方法；並びに

(4) HA又はHA誘導体又はそれらの塩中の還元末端を還元して生じた1級水酸基を酸化してアルデヒド基として、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミンと還元的アルキル化を行う方法；

などが挙げられる。

また、(1)から(4)の方法を二つ以上組み合わせた方法も含まれる。

【0059】

脱水縮合剤を用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中のカルボキシル基を活性化し、アミド結合やエステル結合またはチオエステル結合を形成させる方法の場合、一般的の有機合成に用いられる縮合剤を用いることができるが、好ましくはカルボジイミド類、ホスホニウム類、ウロニウム類等を用いる。カルボジイミド類としては、ジイソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等の非水溶性カルボジイミド、及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等の水溶性カルボジイミドがあり、ホスホニウム類としては、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフ-7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)エート、7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)

) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート等があり、ウロニウム類としては、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N, N-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、O-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N, N-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート等がある。

【0060】

また、これら縮合剤に反応促進性の添加剤を加えてよい。添加剤として、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド、p-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール等が挙げられる。

【0061】

脱水縮合剤を用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中のカルボキシル基を活性化し、アミド結合やエステル結合またはチオエステル結合を形成させる方法の非限定的具体例である、水溶性カルボジイミドによる縮合法では、0.1～1%（重量／容量）のHA水溶液にカルボジイミドを加えた後、アミノ基を有する関節疾患治療薬（MMP阻害剤）を加え、0～35℃で1～24時間反応させることができる。この間、塩酸やリン酸などの酸を添加し、反応液のpHを4～6に維持することもできる。

また、用いる関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）の、水に対する溶解性が低い場合、1～50%の有機溶媒（例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、ジオキサン、エタノール、ピリジンなど）を含む水溶液を反応溶媒とすることも可能であり、この場合、反応系に関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を予め加え、溶けていることを確認した後、カルボジイミドを加えてよい。

さらに、反応促進性の添加剤（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド、p-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール等）とHAとを予め脱水縮合剤で処理し、HAのカルボキシル基を活性エステルとしたものを、一旦単離した後、関節疾

患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を加えて反応させることもできる。

【0062】

関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中の水酸基を臭化シアンを用いて活性化した後、HA又はHA誘導体又はそれらの塩中のアミノ基と結合させる方法、及びHA又はHA誘導体又はそれらの塩中の水酸基を臭化シアンを用いて活性化した後、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミノ基と結合させる方法の非限定的具体例として挙げられるものを以下に記す：

HA又はHA誘導体又はそれらの塩の水溶液に、臭化シアンを加え、0～10℃で5～30分間反応させる。この間、水酸化ナトリウムやリン酸緩衝液などでpHを10～12に維持することもできる。その後、アセトニトリルを加えて沈殿させ、過剰の臭化シアンを取り除き、再度水溶液とし、アミノ基を有する関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を加え、4～25℃で1～24時間反応させる。この間、炭酸水素ナトリウムや水酸化ナトリウムなどで反応液のpHを8～10に維持することもできる。

【0063】

HA又はHA誘導体又はそれらの塩中の還元末端を還元して生じた1級水酸基を酸化してアルデヒド基として、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミンと還元的アルキル化を行う方法の非限定的具体例を以下に記す：

水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤で処理した後、過ヨウ素酸ナトリウムなどの酸化剤で処理することにより得られる、還元末端にアルデヒド基を有するHA又はHA誘導体又はそれらの塩の水溶液に、アミノ基を有する関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を加え、さらに、水素化シアノホウ素ナトリウムを加え、室温で1～24時間反応させる。この間、酢酸、塩酸、リン酸などの酸を加え、pHを4～6に維持することもできる。

【0064】

いずれの縮合法においても、反応後、反応液にエタノール、アセトン等の有機溶媒を加え沈殿させ、沈殿物を、アルコール沈殿、ゲルろ過、透析、イオン交換クロマトグラフィーなどの手段により精製することにより、目的とする結合体を得ることができる。

【0065】

本発明の関節疾患治療薬とヒアルロン酸との結合体を医薬として適用する場合、本発明の結合体は、薬学的に許容できる賦形剤、又は安定剤などと一緒に製剤化してから使用することが好ましい。

医薬の投与形態は特に限定されず、経口投与でも非経口投与でもよく、また、全身投与でも局所投与でもよい。一般的には、本発明の医薬は非経口的に局所投与するのが好ましく、例えば、注射剤として、関節内、静脈内、筋肉内又は皮下に投与することができ、あるいはスプレー剤、局所用クリーム又は軟膏として経皮的に投与することができる。

【0066】

本発明の医薬の投与量は、患者の症状、年齢、性別などに応じて適宜選択できるが、注射剤として用いる場合は一般的には、有効成分である結合体の量として0.01mg/体重kg/日～100mg/体重kg/日、好ましくは0.1mg/体重kg/日～10mg/体重kg/日である。前記1日当たりの投与量の医薬は、一日に数回に分けて投与してもよいし、あるいは1日1回、または2日～28日に1回投与してもよい。

【0067】

【実施例】

実施例1：MMP阻害剤合成

(a) N-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタン

1, 4-ジアミノブタン(10g、113mmol)を水-エタノール(100ml:300ml)に溶解し、冰冷攪拌下、ベンジルオキシカルボニルクロライド(19.35g、113mmol)の1, 2-ジメトキシエタン(50ml)溶液を約30分間で滴下した。2N水酸化ナトリウム水溶液2mlを添加後、そのまま3時間冰冷攪拌し、4℃にて一晩攪拌した。大部分の溶媒を減圧で留去した後、水に溶解し、濃塩酸で酸性にした。クロロホルム(100ml×2)洗浄後、水層を2N水酸化ナトリウム水溶液にてアルカリ性にしてクロロホルムにて抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去して、11.0gの油状物を得た。(收率44%)

¹H-NMR (270MHz, CDCl₃) : δ 1.4-1.5 (4H, m)、2.7 (2H, t)、3.2 (2H, t)、5.1 (2H, s)、7.3-7.4 (5H, m)

MS : 222 (M⁺)

【0068】

(b) N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド

氷冷攪拌下、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニルトリプトファン (2.22g, 4.5mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.90g, 5.85mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (20ml) に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (1.12g, 5.85mmol) を添加し、1時間攪拌した。反応液に、上記得られたN-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタン (1g, 4.5mmol) を加え、そのまま氷冷下で攪拌後、室温にて一夜攪拌を続けた。大部分の溶媒を減圧で留去した後、クロロホルム (100ml) に転溶し、0.5N 塩酸水溶液 (40ml × 2)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50ml)、および飽和食塩水 (50ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、濃縮して得られた残留物をクロロホルム/メタノールを溶出液としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、無色の粉末2.1gを得た。(収率74%)

¹H-NMR (270MHz, CDCl₃) : δ 2.2-3.4 (10H, m)、4.2 (1H, t)、4.3-4.5 (3H, m)、5.1 (2H, s)、7.0-8.0 (18H, m)

【0069】

(c) L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド

上記 (b) で得られた縮合体 (2.1g) をDMF (50ml) に溶かし、ピペリジン (3ml) を添加して室温で30分攪拌した。大部分の溶媒を減圧で留去した後、残留物をクロロホルム/メタノールを溶出液としたシリカゲルカラム

クロマトグラフィーにて精製し、透明の油状物1.0gを得た。（収率74%）

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) : δ 1.4 (4H, m)、3.0-3.4 (6H, m)、3.7 (1H, m)、5.1 (2H, s)、7.0-7.7 (9H, m)

MS: 408 (M^+)

【0070】

(d) (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド：(化合物1a)

L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド (1.18g, 2.9mmol) をDMF 30mlに溶解させ、氷冷攪拌下、公知の方法（特開平6-145148）に基づいて合成した4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルコハク酸 (732mg, 2.6mmol) と、EDC (552mg, 2.9mmol) を順次加え、反応温度を氷冷～水冷とし、3日間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムにて希釈し、クロロホルム層を0.1N塩酸、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水にて順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、ろ過残さと水層を酢酸エチルで再抽出し、酢酸エチル層とクロロホルム層を合わせて減圧濃縮した。得られた粗生成物はシリカゲルクロマトグラフィー精製 (WAKOC-200、溶出溶媒クロロホルム、及びクロロホルム：アセトン=1:1) を行い、得られたフラクションをまとめて減圧濃縮、乾燥し、標題化合物1aを1.20g (68%) 得た。

MS: 670 ($\text{M}+\text{H}^+$)

【0071】

(e) (4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-アミノブチル)アミド：(化合物2)
(4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(S)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-アミノブチル)アミド：(化合物3)
(4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-L-ト

リプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド(化合物1a) (1.20 g, 1.8 mmol)をメタノール50 mlに溶解させ、水素雰囲気常圧下、10%Pd/C 140 mgにて16時間接触還元した。反応液をセライトろ過後、減圧濃縮した。得られた粗生成物を逆相HPLC(カラム: YMC-Pack ODS 250 mm × 20 mm I. D.、溶出溶媒: 0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む水-アセトニトリル系、流速: 1.0 ml/分)にて、ジアステレオマーをそれぞれ分取精製し、凍結乾燥を行い、標題化合物2(親水性側のピーク)のTFA塩283 mgと、標題化合物3(疎水性側のピーク)のTFA塩493 mgとを、それぞれ得た。

【0072】

化合物2:

¹H-NMR (270 MHz, CD₃OD) : 0.70 (3H, d, J = 6 Hz)、0.77 (3H, d, J = 6 Hz)、1.02-1.53 (7H, m)、2.12 (1H, dd, J = 14, 5 Hz)、2.29 (1H, dd, J = 14, 9 Hz)、2.59-2.68 (1H, m)、2.80-2.85 (2H, m)、3.10-3.36 (4H, m)、4.49-4.58 (1H, m)、6.96-7.09 (3H, m)、7.30 (1H, d, J = 8 Hz)、7.57 (1H, d, J = 8 Hz)、7.95-8.04 (2H, m)
MS: 446 (M+H⁺)

【0073】

化合物3:

¹H-NMR (270 MHz, CD₃OD) : 0.51 (3H, d, J = 6 Hz)、0.56 (3H, d, J = 6 Hz)、0.63-0.92 (2H, m)、1.11-1.21 (1H, m)、1.56-1.58 (4H, m)、2.02 (1H, dd, J = 15, 2 Hz)、2.31 (1H, dd, J = 15, 11 Hz)、2.48-2.60 (1H, m)、2.86-3.45 (6H, m)、4.64-4.72 (1H, m)、6.91-7.04 (3H, m)、7.27 (1H, d, J = 8 Hz)、7.54 (1H, d, J = 8 Hz)、7.97-8.08 (2H, m)

MS : 446 (M+H⁺)

【0074】

(f) N-ベンジルオキシカルボニル-1, 8-ジアミノオクタン

上記 (a) におけるN-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタンの合成と同様に、1, 4-ジアミノブタンの代わりに、1, 8-ジアミノオクタンを出発原料として標題化合物を油状物 6. 8 g として得た (収率 58%)。

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) : δ 1.3 (8H, s)、1.4-1.5 (4H, m)、2.7 (2H, t, J=7 Hz)、3.2 (2H, m)、5.1 (2H, s)、7.3-7.4 (5H, m)

MS : 278 (M⁺)

【0075】

(g) N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル)アミド

氷冷攪拌下、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニルトリプトファン (7.8 g, 15.8 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.15 g, 20.5 mmol) のDMF溶液 (100 ml) に、EDC (3.90 g, 20.5 mmol) を添加し、1時間攪拌した。反応液に、上記得られたN-ベンジルオキシカルボニル-1, 8-ジアミノオクタン (4.4 g, 15.8 mmol) を加え、そのまま氷冷下で攪拌後、室温にて一夜攪拌を続けた。大部分の溶媒を減圧で留去した後、クロロホルム (200 ml) に転溶し、0.5 N 塩酸水溶液 (50 ml × 3)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 ml)、および飽和食塩水 (50 ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥後濃縮し、精製せずにそのまま次の反応に用いた。

【0076】

(h) L-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル)アミド

上記 (g) で得られた縮合体をDMF (150 ml) に溶かし、ピペリジン (10 ml) を添加して室温で30分攪拌した。大部分の溶媒を減圧で留去した後、残留物をクロロホルム/メタノールを溶出液としたシリカゲルカラムクロマト

グラフィーにて精製し、黄色の油状物 6. 1 g を得た。 (N-ベンジルオキシカルボニル-1, 8-ジアミノオクタンからの収率 74 %)

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) : δ 1. 2-1. 6 (12 H, m)、2. 9-3. 4 (6 H, m)、3. 7 (1 H, m)、5. 1 (2 H, s)、7. 0-7. 7 (9 H, m)

MS : 465 (M^+)

【0077】

(i) (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル)アミド: (化合物4)

化合物1 a の合成例と同様に、L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの代わりにL-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル)アミド (2. 07 g, 4. 5 mmol) を原料として、標題化合物 2. 5 g を得た (収率 85 %)。但し、反応溶媒は DMF 30 ml とし、反応時間は 2 日間とした。また、減圧濃縮した反応残さは酢酸エチルにて希釈し、再抽出は行わなかった。シリカゲルクロマトグラフィー精製の溶出溶媒には、クロロホルム、及びクロロホルム:アセトン = 2 : 1 を用いた。得られた標題化合物は、そのまま次の反応に使用した。

【0078】

(j) (4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(8-N-アミノオクチル)アミド: (化合物5)
(4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(S)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(8-N-アミノオクチル)アミド: (化合物6)

化合物2 および化合物3 の合成例と同様に、(4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド (1) の代わりに (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル)アミド (化合物4) 2. 5 g (3. 4 mmol) を原料として、標題化合物5 および標題化合物6 のジア

ステレオ混合物（化合物7）1.7gを得た（収率100%）。このジアステレオ混合物のうち、360mgを逆相HPLCにて、ジアステレオマーをそれぞれ分取精製し、凍結乾燥を行い、標題化合物5（親水性側のピーク）のTFA塩151mgと、標題化合物6（疎水性側のピーク）のTFA塩147mgとを、それぞれ得た。

【0079】

化合物5：

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : 0.74 (3H, d, J = 6Hz)、0.79 (3H, d, J = 6Hz)、0.97-1.59 (15H, m)、1.91 (1H, dd, J = 14, 8Hz)、2.03 (1H, dd, J = 14, 7Hz)、2.62-2.83 (3H, m)、2.89-3.12 (4H, m)、4.40-4.48 (1H, m)、6.95 (1H, dd, J = 7, 7Hz)、7.04 (1H, dd, J = 7, 7Hz)、7.11 (1H, d, J = 2Hz)、7.30 (1H, d, J = 8Hz)、7.54 (1H, d, J = 8Hz)、7.58-7.81 (4H, m)、8.01 (1H, d, J = 8Hz)、8.73 (1H, s)、10.38 (1H, s)、10.78 (1H, s)
MS : 502 (M+H⁺)

【0080】

化合物6：

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : 0.55 (3H, d, J = 5Hz)、0.66 (3H, d, J = 5Hz)、0.75-1.59 (15H, m)、1.94 (1H, dd, J = 15, 5Hz)、2.14 (1H, dd, J = 15, 9Hz)、2.57-3.38 (7H, m)、4.32-4.44 (1H, m)、6.95 (1H, dd, J = 7, 7Hz)、7.04 (1H, dd, J = 7, 7Hz)、7.10 (1H, brs)、7.30 (1H, d, J = 8Hz)、7.53 (1H, d, J = 8Hz)、7.65 (3H, brs)、7.90 (1H, t, J = 6Hz)、8.19 (1H, d, J = 8Hz)、8.73 (1H, brs)、10.45 (1H, s)、10.78 (1H, s)
MS : 502 (M+H⁺)

【0081】

(k) N-ベンジルオキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン

上記 (a) におけるN-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタンの合成と同様に、1, 4-ジアミノブタンの代わりに、4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンを出発原料として標題化合物を油状物5.0 gとして得た (収率39%)。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) : δ 1.6-1.7 (4H, m)、2.8 (2H, t, $J=6.7\text{Hz}$)、3.3 (2H, m)、3.5-3.6 (1.2H, m)、5.1 (2H, s)、5.6 (1H, brs)、7.3-7.4 (5H, m)

MS : 354 (M^+)

【0082】

(1) N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサ-トリデカニル)アミド

上記 (b) におけるN-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの合成と同様に、N-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタンの代わりに、N-ベンジルオキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンを出発原料として標題化合物を油状物8.0 gとして得た (収率39%)。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) : δ 1.42-1.59 (2H, m)、1.64-1.75 (2H, m)、3.09-3.32 (10H, m)、3.42-3.60 (8H, m)、4.20 (1H, t, $J=6.8\text{Hz}$)、4.31-4.50 (3H, m)、5.06 (2H, s)、5.24 (1H, brs)、5.70 (1H, brs)、6.08 (1H, brs)、6.99 (1H, s)、7.07-7.19 (2H, m)、7.27-7.42 (10H, m)、7.54-7.58 (2H, m)、7.66 (1H, d, $J=7.3\text{Hz}$)、7.

7.6 (2H, d, $J = 7.6$ Hz)、8.89 (1H, b r s)
 MS: 785.6 ($M + Na^+$)

【0083】

(m) L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル)アミド

上記(c)におけるL-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの合成と同様に、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの代わりに、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル)アミドを出発原料として、標題化合物を油状物4.2gとして得た(収率78%)。

1H -NMR (270MHz, CDCl₃) : δ 1.64-1.77 (4H, m)、2.95-3.04 (1H, m)、3.23-3.36 (7H, m)、3.45-3.69 (11H, m)、5.08 (2H, s)、5.34 (1H, b r s)、7.05-7.21 (3H, m)、7.26-7.38 (6H, m)、7.54-7.58 (2H, m)、7.66 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)、8.51 (1H, b r s)

MS: 541 (M^+)

【0084】

(n) (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-(2R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル)アミド(化合物8)

化合物1aの合成例と同様に、L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの代わりにL-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル)アミド(1.30g, 2.4mmol)と、公知の方法(特開平6-145148)に基づいて合成した4-(N-ベンジルオキシアミノ)-(2R)-イソブチルこはく酸(0.56g, 2.0mmol)を原料として、標題化

合物8を1.15g（収率72%）の無色のアモルファスとして得た。但し、反応溶媒はDMF 20mlとし、反応温度は室温、反応時間は6時間とした。また、減圧濃縮した反応残さは酢酸エチルにて希釈し、クロロホルム層を硫酸水素カリウム水溶液、水、飽和炭酸水素カリウム水溶液、飽和食塩水にて順次洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。シリカゲルクロマトグラフィー精製の溶出溶媒には、酢酸エチル及びジクロロメタン：メタノール=9：1を用いた。

【0085】

¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆) : δ 0.74 (3H, d, J=5.9Hz)、0.80 (3H, d, J=6.5Hz)、0.93-1.05 (1H, m)、1.41-1.29 (2H, m)、1.51-1.58 (2H, m)、1.60-1.67 (2H, m)、1.94 (1H, dd, J=14.0, 7.3Hz)、2.08 (1H, dd, J=14.3, 7.3Hz)、2.65-2.78 (1H, m)、2.92-3.14 (6H, m)、3.26 (2H, t, J=6.5Hz)、3.38-3.48 (12H, m)、4.47 (1H, d, J=7.8, 6.7Hz)、4.76 (2H, s)、5.00 (2H, s)、6.94 (1H, dd, J=7.6, 7.2Hz)、7.04 (1H, dd, J=8.1, 7.2Hz)、7.12 (1H, s)、7.22 (1H, t, J=5.7Hz)、7.29-7.34 (11H, m)、7.55 (1H, d, J=7.6Hz)、7.79 (1H, t, J=5.4Hz)、8.05 (1H, d, J=7.8Hz)、10.78 (1H, s)、11.01 (1H, s)

【0086】

(o) (4-(N-ヒドロキシアミノ)-(2R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(13-N-アミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)アミド(化合物9)

(4-(N-ベンジルオキシアミノ)-(2R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)アミド(化合物8) (1.90g, 2.4mmol)をメタノール200mlに溶解させ、炭酸水素ナトリウム200mgを加え、水素雰囲気常圧下、10%Pd/C 200mgにて3時間接触還元し

た。反応液をセライトろ過後、減圧濃縮したところ標題化合物9が無色のアモルファスとして1.50g（収率99%）得られた。

【0087】

¹H-NMR (270MHz, CD₃OD) : δ 0.84 (3H, d, J=5.9Hz)、0.89 (3H, d, J=6.2Hz)、1.17 (1H, ddd, J=11.9, 7.6, 5.1Hz)、1.38-1.54 (2H, m)、1.56-1.65 (2H, m)、1.71-1.81 (2H, m)、2,15 (1H, dd, J=14.9, 7.4Hz)、2.28 (1H, dd, J=14.3, 7.4Hz)、2.78 (1H, t, J=6.8Hz)、2.80 (1H, brs)、3.09-3.32 (6H, m)、3.44-3.49 (2H, m)、3.52-3.65 (8H, m)、4.62 (1H, t, J=7.3Hz)、7.04 (1H, dd, J=7.6, 7.0Hz)、7.12 (1H, dd, J=8.0, 7.0Hz)、7.15 (1H, s)、7.37 (1H, d, J=8.0Hz)、7.65 (1H, d, J=7.6Hz)

MS : 578 (M+H⁺)

【0088】

実施例2：結合体の合成例1

MMP阻害剤（化合物2）70mgに、N-メチルピロリドン0.49mlとピリジン0.01mlを加えて溶かし、1M塩酸0.045mlと水でpHを4.7に調整し、全量を1mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム5mgに加え、均一とした。再度pH4.7を確認し、氷冷下、EDC10mgを加え30分攪拌し、その後室温で15時間攪拌した。

【0089】

反応液に、0.1M重曹1mlとエタノール6mlを加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（沈殿を0.2M食塩水1mlに溶かし、エタノール3mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、4.3mgの結合体（「結合体1」）を得た。

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合量は、0.84重量%であった。これは、0.76%のカルボキシル基が反応したことに

相当する。

【0090】

実施例3：結合体の合成例2

MMP阻害剤（化合物3）70mgに、N-メチルピロリドン0.49mlとピリジン0.01mlを加えて溶かし、1M塩酸0.045mlと水でpHを4.7に調整し、全量を1mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム塩5mgに加え、均一とした。再度pH4.7を確認し、氷冷下、EDC10mgを加え30分攪拌し、さらに室温で20時間攪拌した。

【0091】

反応液に、0.1M重曹1mlとエタノール6mlを加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（0.2M食塩水1mlに溶かし、エタノール3mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、3.5mgの結合体（「結合体2」）を得た。

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合量は、1.1重量%であった。これは、1.0%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

【0092】

実施例4：結合体の合成例3

MMP阻害剤（化合物7）77mgに、N-メチルピロリドン0.603mlとピリジン0.012mlを加えて溶かし、1M塩酸0.105mlと水でpHを4.7に調整し、全量を1.23mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム塩6.2mgに加え、均一とした。再度pH4.7を確認し、氷冷下、EDC24mgを加え4°Cで3日間攪拌した。

【0093】

反応液に、1MNaOH0.123mlとエタノール0.5mlを加え氷冷下30分攪拌した後、さらにエタノール3ml加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（0.2M食塩水1mlに溶かし、エタノール3mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、6.0mgの結合体（「結合体3」）を得た。

インドール環に由来する279 nmでのUV吸収から算出された結合量は、1.7重量%であった。これは、1.4%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

【0094】

実施例5：結合体の合成例4

MMP阻害剤（化合物7）189 mgに、N-メチルピロリドン1.47 mlとピリジン0.03 mlを加えて溶かし、1M塩酸0.24 mlと水でpHを4.7に調整し、全量を3 mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム15 mgに加え、均一とした。再度pH 4.7を確認し、氷冷下、EDC 87 mgを加え4°Cで24時間攪拌した。

【0095】

反応液に、0.1M重曹1.5 mlとエタノール1.5 mlを加え氷冷下30分攪拌した後、さらにエタノール9 ml加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（沈殿を0.2M食塩水3 mlに溶かし、エタノール9 mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、13.9 mgの結合体（「結合体4」）を得た。

インドール環に由来する279 nmでのUV吸収から算出された結合量は、4.9重量%であった。これは、3.9%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

【0096】

実施例6：結合体の合成例5

結合体の合成例3と同じ原料や試薬を用い、同様の操作を行ったところ、5.7 mgの「結合体5」を得た。

インドール環に由来する279 nmでのUV吸収から算出された結合量は、結合体の合成例3の時と再現性よく、1.7重量%であった。これは、1.4%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

【0097】

実施例7：結合体の合成例6

MMP阻害剤（化合物9）145 mgに、N-メチルピロリドン0.89 ml

とピリジン0.02mlを加えて溶かし、6M塩酸0.09mlと水でpHを4.7に調整し、全量を1.82mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム9.1mgに加え、均一とした。再度pH4.7を確認し、氷冷下、EDC35mgを加え4℃で24時間攪拌した。

【0098】

反応液に、0.1M重曹0.375mlとエタノール0.375mlを加え氷冷下30分攪拌した後、さらにエタノール5ml加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（沈殿を0.2M食塩水2mlに溶かし、エタノール6mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、8.2mgの結合体（「結合体6」）を得た。

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合量は、1.0重量%であった。これは、0.70%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

【0099】

実施例8：結合体の合成例7

N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド8.9mgを水に溶かし、ピリジン0.01mlと1M塩酸0.07mlとでpHを4.7に調整し、全量を1mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム5mgに加え、均一とした。氷冷下、EDC9.6mgを加え4℃で17時間攪拌した。氷冷下、2%酢酸ナトリウム緩衝液（pH6）0.5mlを加えた後、アセトン4mlを加え沈殿を析出させた。沈殿を遠心分離し、減圧で乾燥した。

MMP阻害剤（化合物9）のTFA塩（化合物10）【MMP阻害剤（化合物9）を0.1%TFAを含む蒸留水に懸濁し、凍結乾燥することにより得た】を、N-メチルピロリドン0.49mlとピリジン0.01mlを加えて溶かし、1M塩酸0.035mlと水でpHを8.0に調整し、全量を1mlとした。これを上述の沈殿物に加え、4℃で3日間攪拌した。

【0100】

反応液に、2M食塩水0.2mlとエタノール3mlを加え沈殿させ、沈殿物を遠心分離した。この沈殿に0.2M食塩水1mlと1M水酸化ナトリウム水溶

液0.06mlを加え、氷冷下1時間攪拌し可溶化させ、エタノール3mlで沈殿を析出させ、沈殿を遠心分離した。再度、この沈殿に0.2M食塩水1mlと1M水酸化ナトリウム水溶液0.06mlを加え、氷冷下3時間攪拌し可溶化させ、エタノール3mlで沈殿を析出させ、沈殿を遠心分離した。引き続き、沈殿を0.2M食塩水1mlに溶かし、エタノール3mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離し、さらにこの沈殿を90%エタノール/水で懸濁し遠心分離した後、水に溶かして凍結乾燥することで、6.0mgの結合体（「結合体7」）を得た。

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合量は、1.1重量%であった。これは、0.78%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

【0101】

試験例1：マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）阻害活性

コラゲナーゼ-1、ストロメリシン-1、ゲラチナーゼAおよびゲラチナーゼBに対する「結合体1」、「結合体7」およびHAの酵素阻害活性を測定した。なお、コラゲナーゼ-1とストロメリシン-1に対する阻害活性は、ヤガイ社製のI型コラゲナーゼ活性測定キットとストロメリシン-1測定キットをそれぞれ用いて測定し、ゲラチナーゼAおよびゲラチナーゼBに対する阻害活性は、ロッシュ・ダイアグノスティック社製のゲラチナーゼ活性測定キットを用いて測定した。結果は、薬物非添加時の酵素活性を100とした時の酵素活性の平均値として表示した(n=2)。図1、図2、図8及び図9に示したように、「結合体1」及び「結合体7」はこれら4種類のいずれの酵素に対しても阻害活性を有していたが、HAは阻害活性を示さなかった。

これらの実験結果から、「結合体1」及び「結合体7」はHAにはない、MMP阻害活性を有していることが判明した。

【0102】

試験例2：マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）阻害活性に及ぼすスペーサーの影響

特許第2736285号公報記載のMMP阻害剤（N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシカルボニルアミド)-プロパノイル]-L-トリプトファ

ンメチルアミド：化合物1）とHA間のスペーサー長をC4からC10に変えた4種類の結合体（結合体1、結合体3、結合体4及び結合体6）について、ゲラチナーゼAおよびゲラチナーゼBに対する阻害活性を比較した。結果は、薬物非添加時の酵素活性を50%阻害するのに必要な薬物濃度（IC₅₀値）で表した（下記の表1）。スペーサー長が大きくなるに従い、ゲラチナーゼAに対する阻害活性が強くなる傾向が若干見られたが、これら4種類の結合体間で阻害活性に大きな違いは認められず、この結果から、同じ合成法（HAとMMP阻害剤を混合した後、縮合剤を加える方法）で調製した結合体（結合体1、結合体3、結合体4、結合体6）の間で比較すると、阻害活性に及ぼすスペーサー長の影響は少ないものと考えられた。

また、「結合体6」と、HAを予め活性エステルとした後、MMP阻害剤を加えて反応させる方法で合成した「結合体7」とを比較すると、スペーサーは同一かつ阻害剤の結合量はほぼ同じであるにもかかわらず、ゲラチナーゼAの阻害活性には約10倍の差が見られた。このことから、合成法の違いによって、結合後のMMP阻害剤の阻害活性は、結合前の阻害活性から変化する可能性が示唆された。

【0103】

【表1】

表1：

MMP阻害活性に及ぼすスペーサーの影響

結合体	スペーサー	酵素阻害活性 (IC ₅₀ , mg/ml)	
		ゲラチナーゼA	ゲラチナーゼB
結合体1	C ₄ H ₈ -NH-	1	0.03
結合体3	C ₈ H ₁₆ -NH-	0.7	0.04
結合体4	C ₈ H ₁₆ -NH-	0.2	0.02
結合体6	C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	0.2	NT
結合体7	C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH-	0.02	0.01

【0104】

試験例3：コラーゲンフィルム破壊阻害活性

Gavrilovic, Jらの方法 (Cell. Biol. Int. Reports, 9, 1097-1107(1985)) に従って行った。3~6週齢のウサギ膝関節からコラゲナーゼ処理により回収した関節軟骨細胞を、¹⁴Cでラベルしたモルモット皮膚由来タイプI型コラーゲンフィルム上に播種し、「結合体3」またはHAをインターロイキン1 (1 ng/ml) とプラスミン (100 μg/ml) の存在下、37℃のCO₂インキュベーター内で72時間培養した。培養終了後、培養上清と、残存するコラーゲンフィルムをコラゲナーゼ処理した消化液を回収し、それぞれの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。結果は下記の式に従って、破壊されたコラーゲンフィルムの破壊率を%の平均値として算出した (n=2)。

【0105】

コラーゲンフィルム破壊率(%) = [(培養上清中の放射活性) / (培養上清中の放射活性 + 残存したコラーゲンフィルム中の放射活性)] × 100

【0106】

図3に示したように、「結合体3」はインターロイキン1とプラスミンによって誘導された細胞性のコラーゲン破壊を抑制したが、HAは抑制効果を示さなかった。

この結果から、HAとMMP阻害剤との結合体は、HAでは抑制しえない関節軟骨細胞によるコラーゲン破壊に対しても優れた抑制効果を持つことが明らかとなった。

【0107】

試験例4：結合体の結合安定性1

「結合体5」を1mg/mlの濃度で生理食塩水に溶解（この時点でのpH=6.3であった）し、37℃でインキュベートし、ゲルろ過クロマトグラフィーで結合体の変化を分析した。

カラムはTSKgel G4000PW (7.5mm I. D. × 30cm、東ソー社製)、溶出溶媒は20%エタノールを含む50mMりん酸緩衝液(pH6)、カラム温度は40℃ (L-7300、日立製)、流速は0.7ml/分 (L-7100、日立製)、検出にはダイオードアレイ検出器 (L-7450H、日立製) を用いた。

【0108】

40μlの溶解液をインジェクションした際の、ボイドのインドール環由来の279nmでの吸収によるピーク面積を0日、2日、5日と追跡したところ、変化は認められなかった（図4）。また、この5日間で、低分子量領域への新たなピークの出現はHPLC上認められなかった。

この結果から、「結合体5」のHAとMMP阻害剤との間の結合の良好な結合安定性が示された。

【0109】

試験例5：結合体の結合安定性2

化合物1、化合物1とHAの混合物および「結合体4」を、それぞれ、Millipore社製の膜孔直径25nmの半透膜(TypeHC)で区切り、等張リン酸緩衝液溶液(pH7.4)を満たした拡散セル(ドナー側:1.5ml、アクセプター側:8.0ml)に入れ、ドナー側からアクセプター側への漏出を測定波長350nmの蛍光強度から算出し、透過率として表した(図5)。ここで、透過率100%とは、薬物全量が拡散し、セル内が均一となったときの濃度を意味する。

1 化合物1 50nmol

2 化合物1 50nmol と HA 0.5mgの混合物

3 「結合体4」 0.5mg(化合物1 50nmol相当が結合)

【0110】

化合物1および化合物1とHAの混合物の場合、化合物1は速やかに膜を透過し、アクセプター側へ拡散したが、「結合体4」は8時間まで透過せず、24、48時間で2.8、3.6%が、それぞれ透過するに止まった。

この結果から「結合体4」のHAとMMP阻害剤との間の結合の良好な結合安定性が示された。

【0111】

試験例6：関節内貯留性

9～10週齢のラット(n=4～10)の右膝関節内に以下の薬物(1～3)を投与後、経時的に動物を屠殺し、計0.5mlの生理食塩水で関節腔内を洗浄して関節液を回収した。

1 化合物1 30nmol

2 化合物1 30nmol と HA 0.3mgの混合物

3 「結合体4」 0.3mg(化合物1 30nmol相当が結合)

【0112】

ロッシュ・ダイアグノスティック社製のゲラチナーゼ活性測定キットを用い、下記の式より、関節液のゲラチナーゼBに対する阻害活性を算出した。

【0113】

ゲラチナーゼB阻害活性(%) = [(関節液非存在化の酵素活性 - 関節液添加時の酵素活性) / 関節液非存在化の酵素活性] × 100

【0114】

化合物1と「結合体4」のゲラチナーゼBに対する用量・阻害曲線をもとに、化合物1単独および化合物1とHAの混合物投与群では化合物1の量そのもの、「結合体4」投与群では「結合体4」に結合した化合物1相当量を薬物量として、関節液中に残存する薬物量を算出した。結果は平均値で表示した。図6に示したように、化合物1単独および化合物1とHAの混合物投与群では、関節内に残存した薬物量は、いずれも投与2時間後には投与量（図中の0時間目の薬物量）の約1/3000に減少し、化合物1単独投与群では投与6時間、化合物1/HAの混合物投与群では投与17時間後に、それぞれ投与量の1/300000にまで減少した。これに対して「結合体4」投与群では、投与2時間後では投与量の2/5、投与17時間後でも投与量の1/10程度の薬物が残存していた。

【0115】

図7には、投与直後（図の0時間目）、2時間後および17時間後に各薬物投与群より回収された関節液のゲラチナーゼB阻害活性を示した。結果は平均値±標準偏差で表示した。化合物1単独および化合物1とHAとの混合物投与群の関節液のゲラチナーゼB阻害活性は、いずれも投与2時間後には20%、投与17時間後には5%以下にまで減少していたのに対して、「結合体4」投与群では投与17時間後でも、50%程度残存していた。

【0116】

これらの結果から、HAとMMP阻害剤との結合体は、関節腔内でのMMP阻害剤の貯留性を高めるための手段として、極めて優れた手段となり得ることが明らかとなった。また、HAとMMP阻害剤との結合体は、関節腔内でも長時間に渡ってMMP阻害活性を保持し、単回の関節内投与でも長期に渡って関節破壊を阻害しうる可能性が示唆された。

すなわち、本発明のMMP阻害剤とHAとの結合体は、各々単独、並びにMMP阻害剤とHAとの合剤よりも、関節疾患治療薬としての効果および貯留性が優れることが示唆された。

【0117】

【発明の効果】

本発明の結合体は、例えば、投与された関節腔内において、通常のHA製剤と同様に長期間貯留し、かつ、分子中のヒドロキサム酸はHA又はHA誘導体又はそれらの塩に結合した状態で局所のMMPを阻害しうる。そのため、既存技術では成しえなかつた関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）の投与部位（例えば、膝、肩等の関節が挙げられる）での作用の限局・長期化および投与回数の低減が可能であり、従来の全身投与に比べて、関節疾患治療薬の副作用を大幅に軽減することが期待される。

【0118】

また、投与部位において、HA又はHA誘導体又はそれらの塩の製剤成分と関節疾患治療薬成分の両者は、解離、分解を受けずにそれぞれの薬効を発現しうるので、両者の相乗的な薬効が期待できる。

【0119】

以上の点より、本発明の結合体は、関節疾患治療薬（例えば、ヒドロキサム酸などのMMP阻害剤）とHA又はHA誘導体又はそれらの塩の両方の薬物としての有用性が改善された薬剤、例えば、関節破壊抑制作用が強化された薬剤として、優れた変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎の治療薬となることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の結合体による各種酵素に対する阻害活性を示すグラフである。

【図2】

図2は、本発明の結合体による各種酵素に対する阻害活性を示すグラフである。

【図3】

図3は、本発明の結合体によるコラーゲンフィルム破壊阻害活性を示すグラフである。

【図4】

図4は、本発明の結合体の結合安定性を示すグラフである。

【図5】

図5は、本発明の結合体の結合安定性を示すグラフである。

【図6】

図6は、本発明の結合体のラット関節腔貯留性を示すグラフである。

【図7】

図7は、本発明の結合体のラット関節腔貯留性を示すグラフである。

【図8】

図8は、本発明の結合体による各種酵素に対する阻害活性を示すグラフである

【図9】

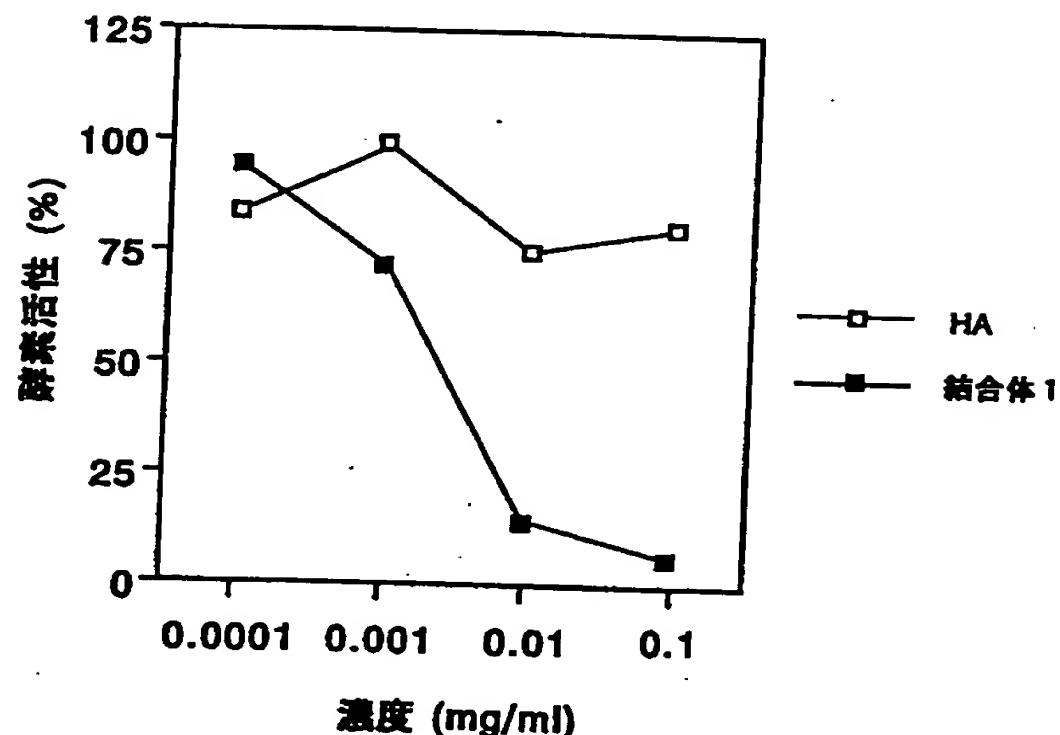
図9は、本発明の結合体による各種酵素に対する阻害活性を示すグラフである

【書類名】 図面

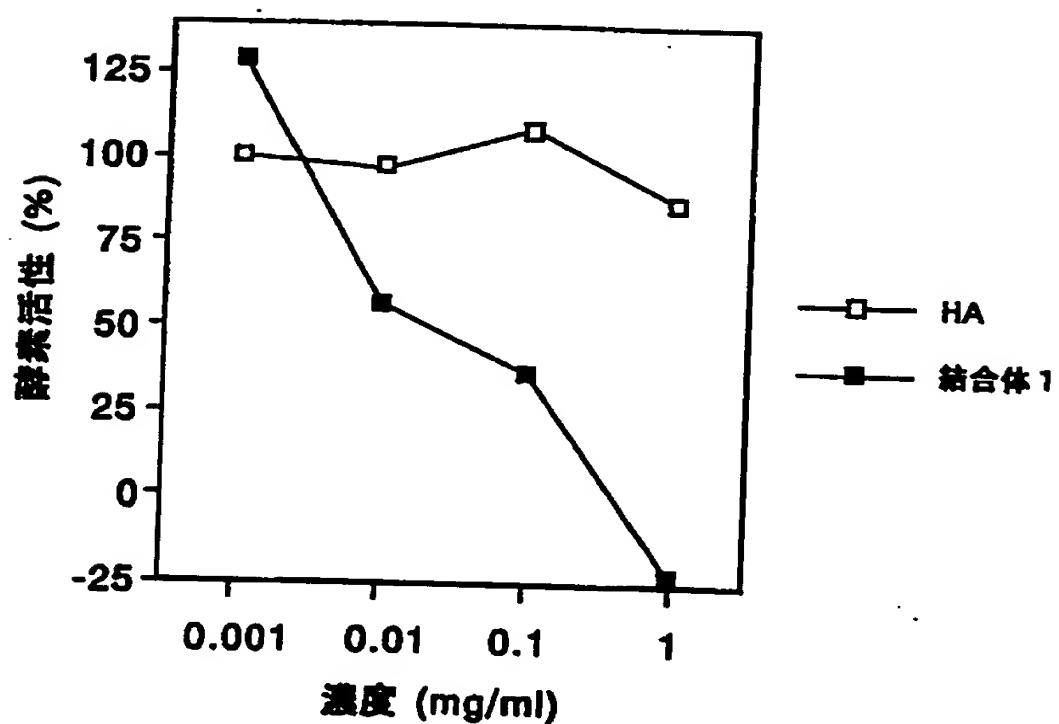
【図1】

図1： MMP阻害活性

コラゲナーゼ-1に対する阻害活性



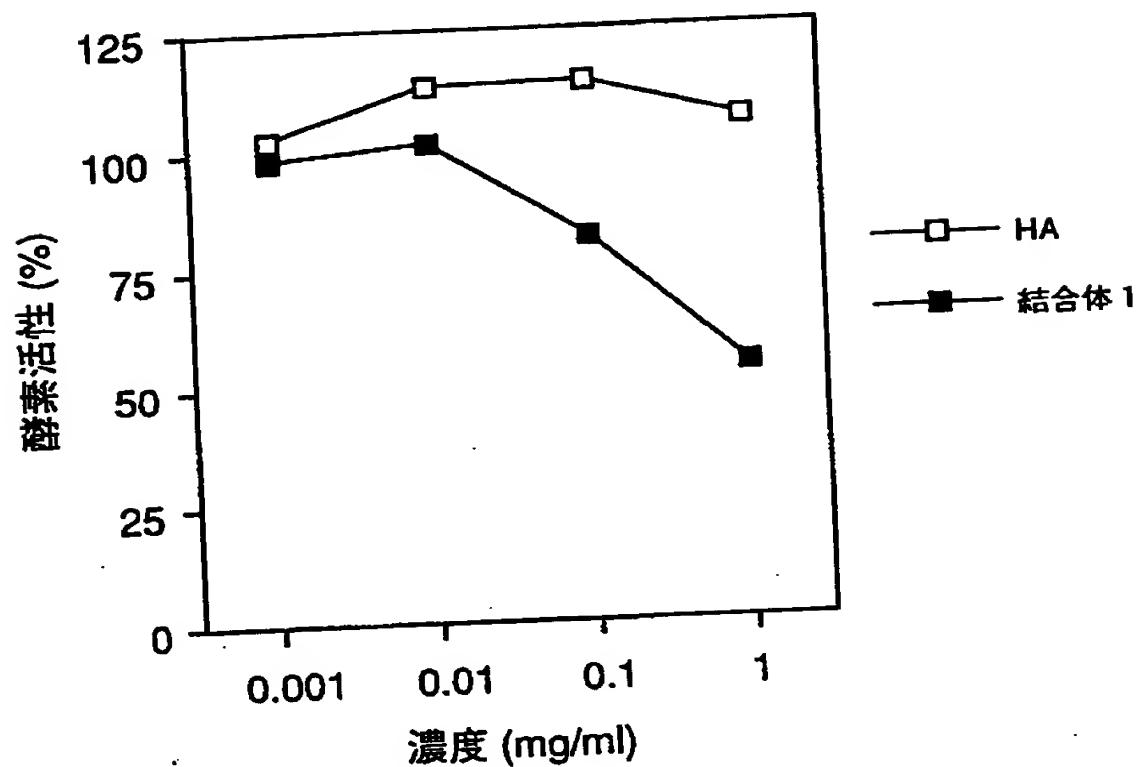
ストロメライシン-1に対する阻害活性



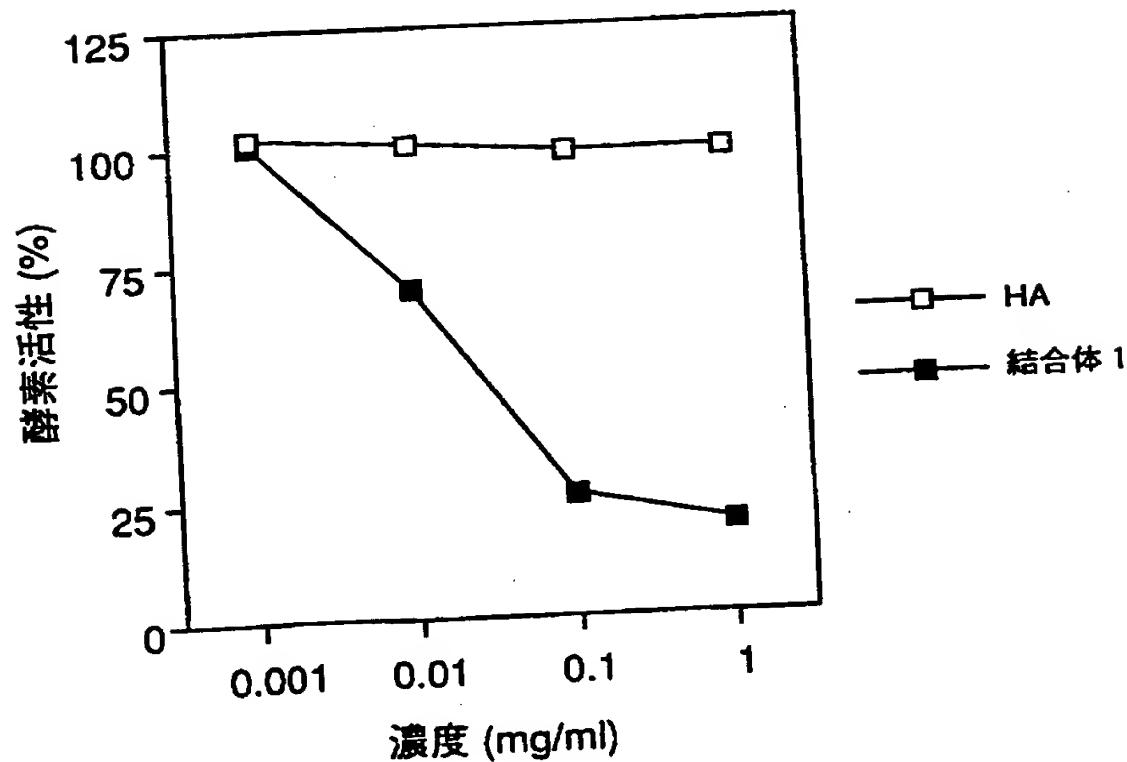
【図2】

図2：MMP阻害活性

ゲラチナーゼAに対する阻害活性

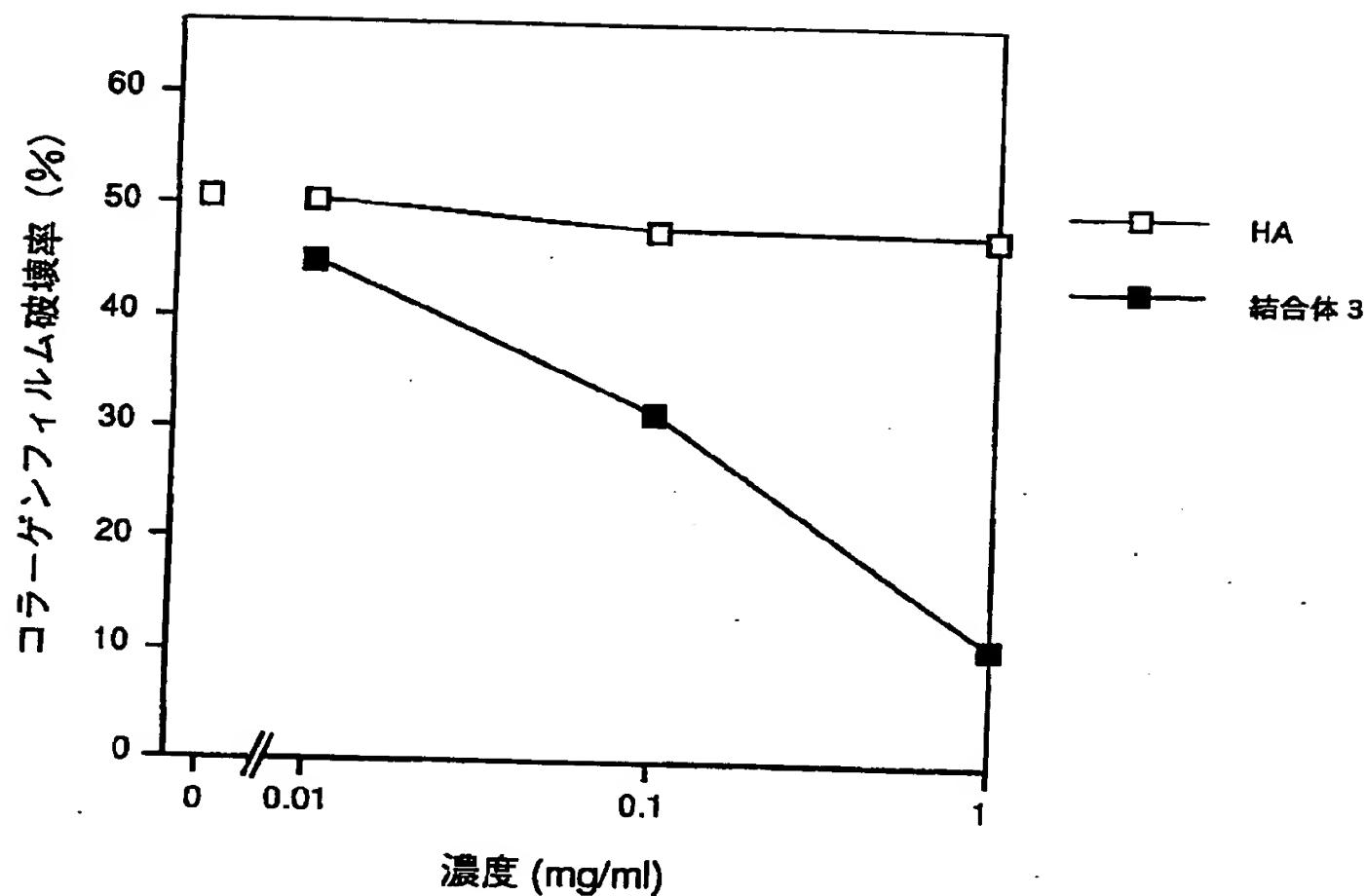


ゲラチナーゼBに対する阻害活性



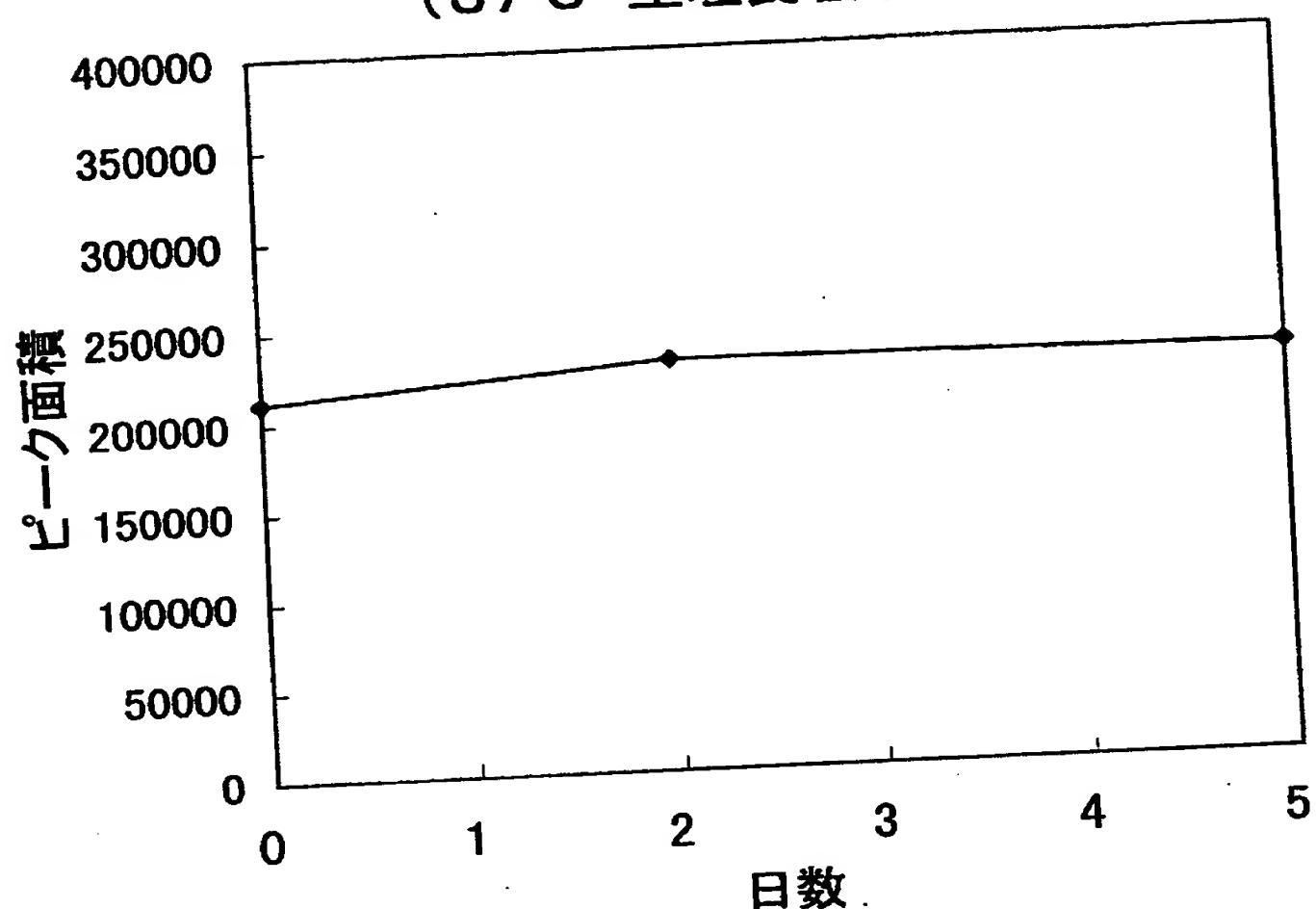
【図3】

図3：コラーゲンフィルム破壊阻害活性



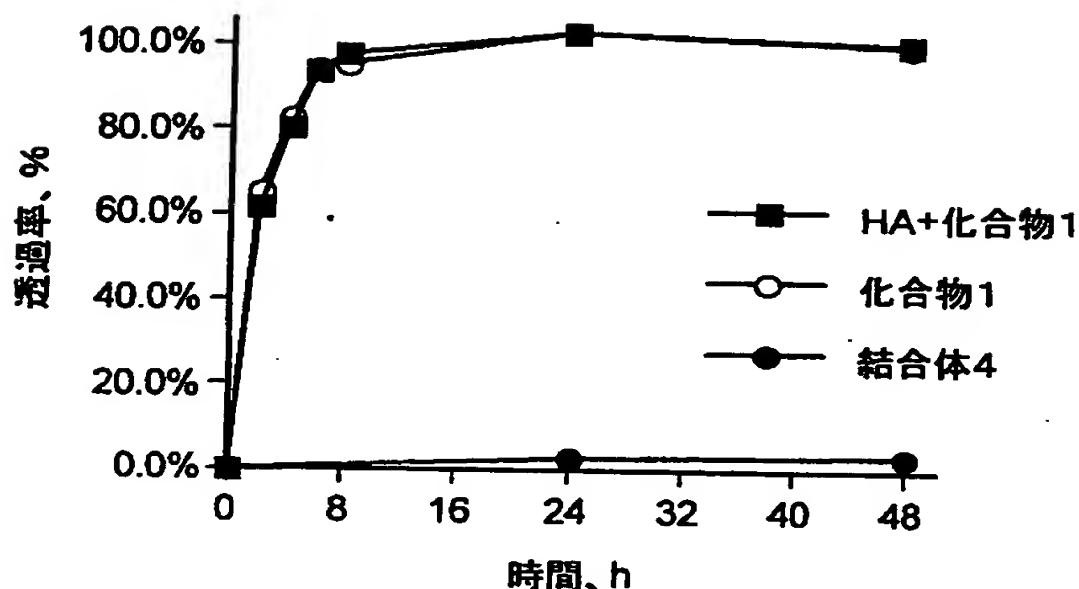
【図4】

図4.「結合体5」の安定性
(37°C 生理食塩水中)



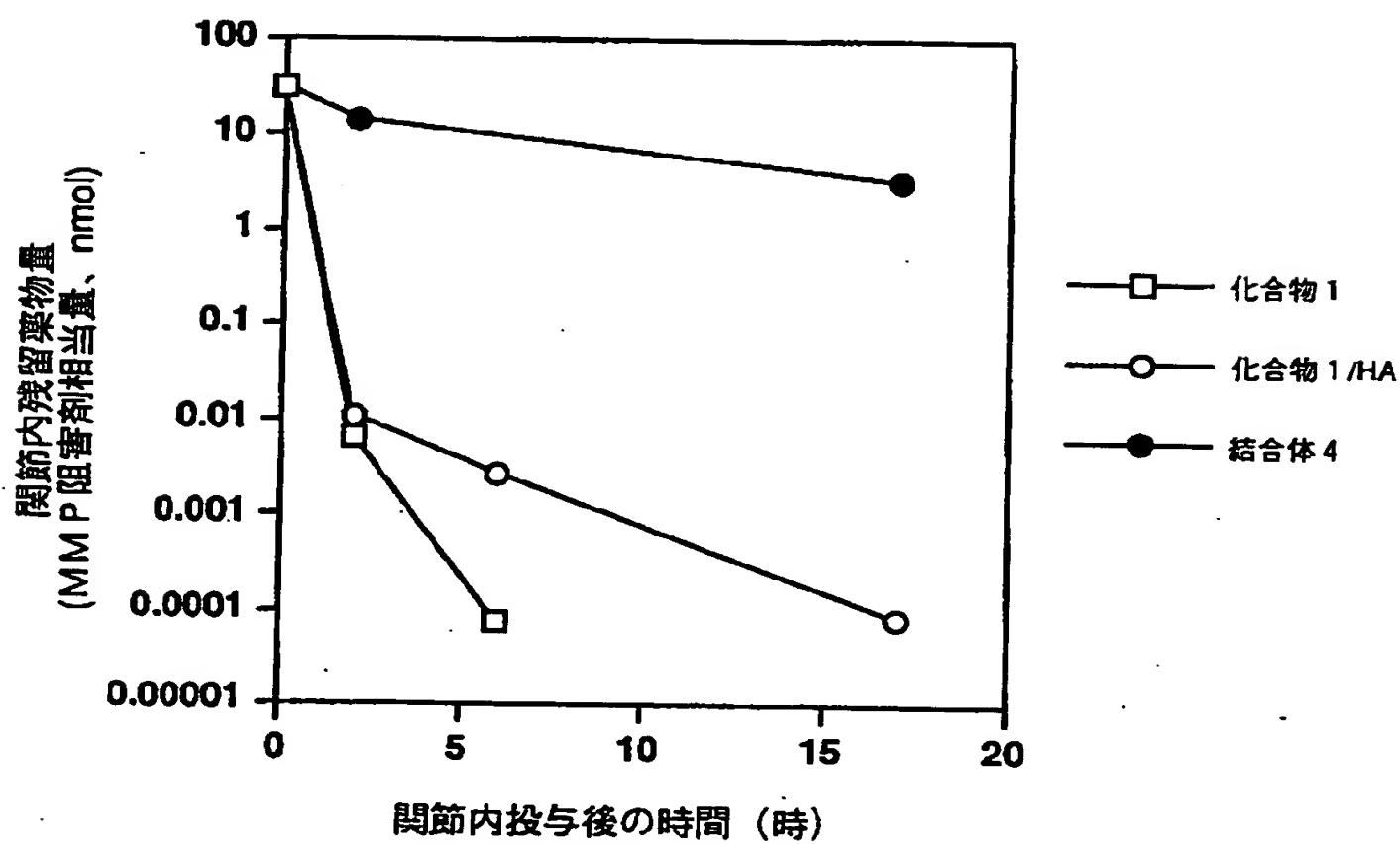
【図5】

図5：結合体4の半透膜に対する透過性



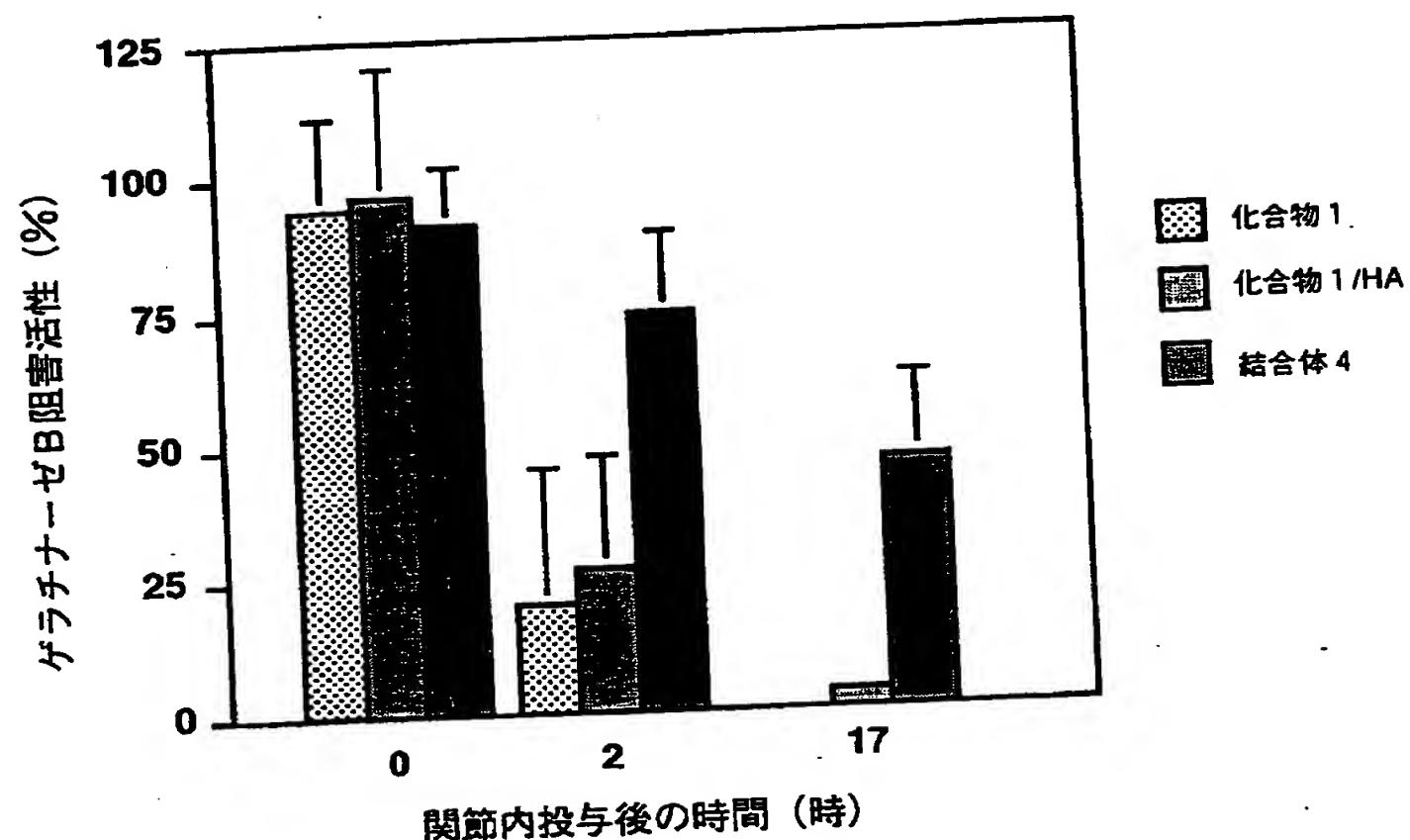
【図6】

図6：ラット関節腔貯留性



【図7】

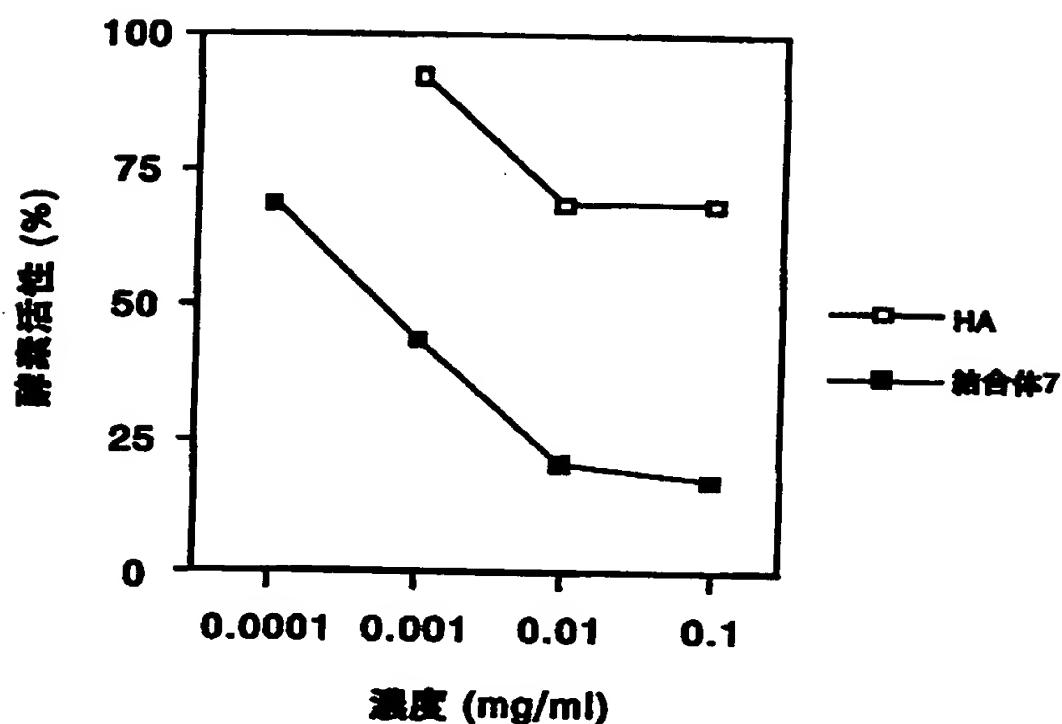
図7：ラット関節腔貯留性



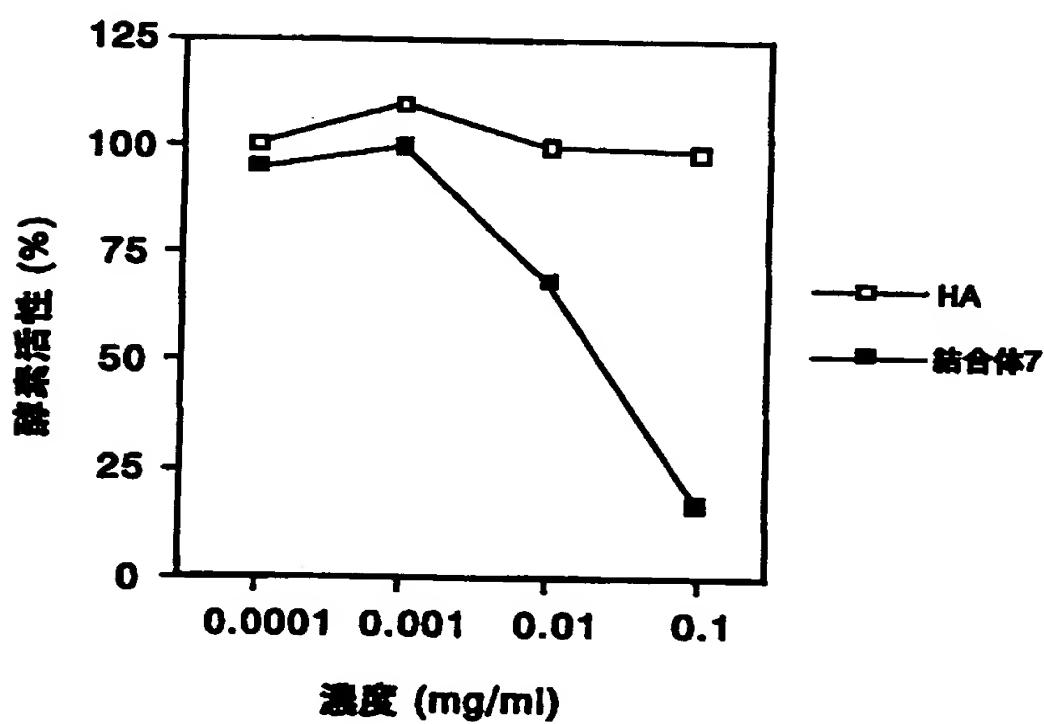
【図8】

図8： MMP阻害活性

コラゲナーゼ-1に対する阻害活性



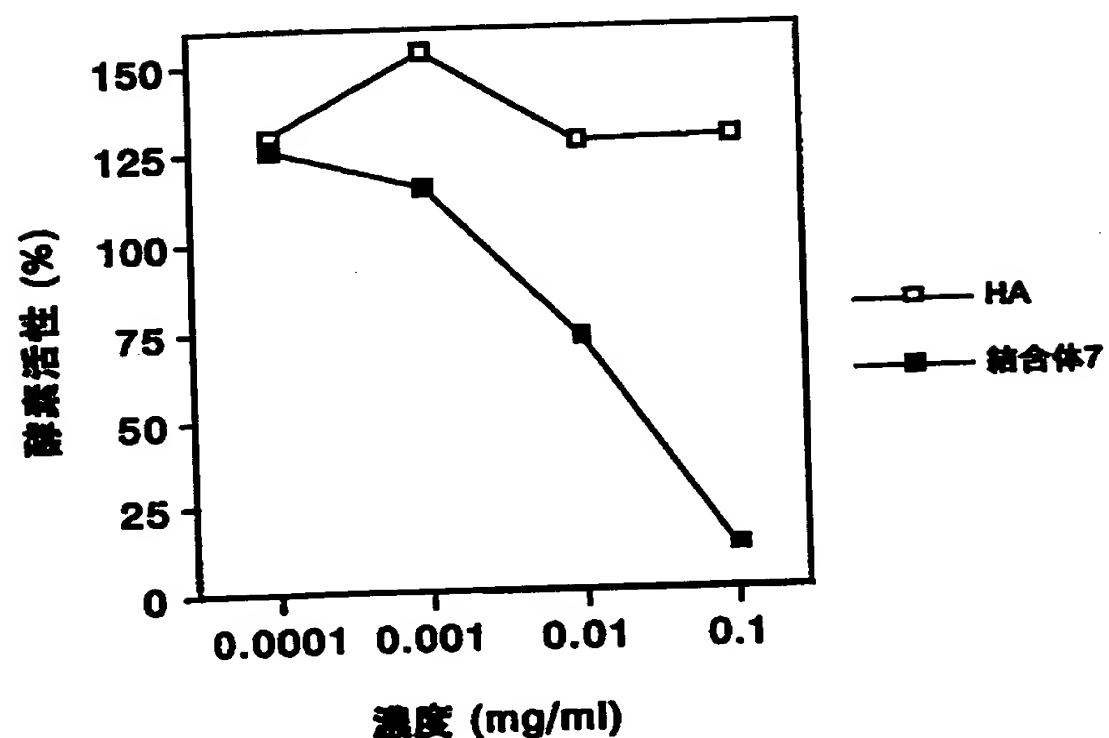
ストロメライシン-1に対する阻害活性



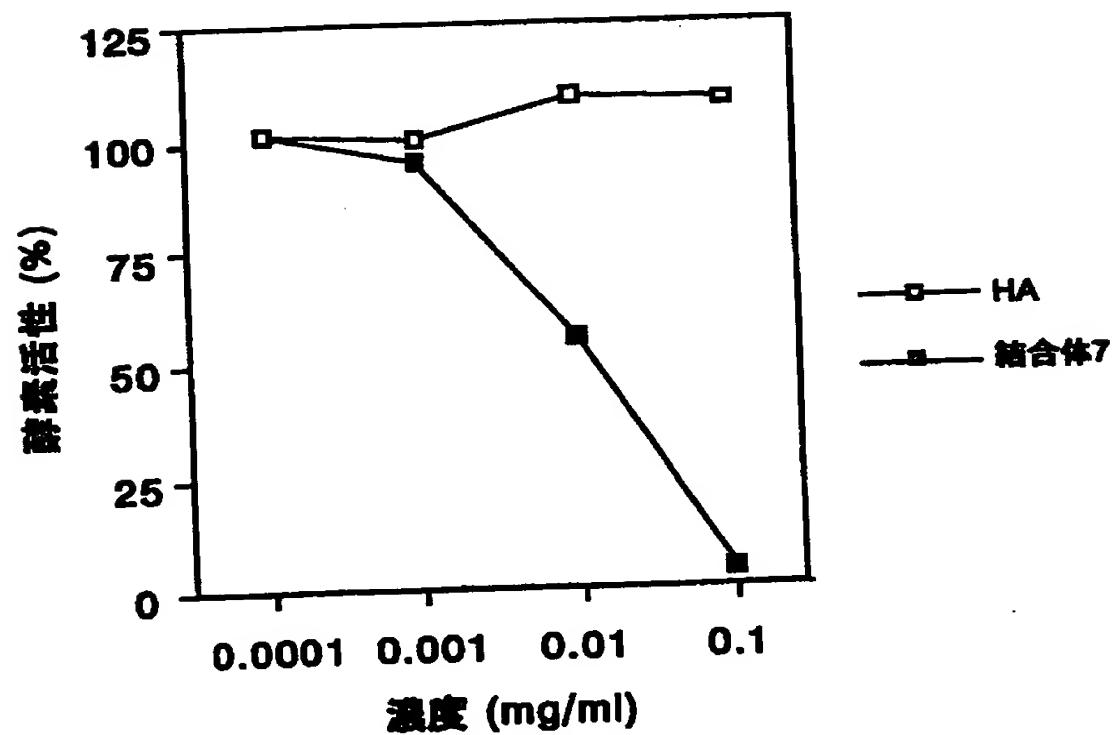
【図9】

図9：MMP阻害活性

ゲラチナーゼAに対する阻害活性



ゲラチナーゼBに対する阻害活性



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 関節疾患治療薬を関節腔内に貯留させることのできる、関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体を提供すること。

【解決手段】 1種以上の関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体；関節疾患治療薬（例えば、マトリックスプロテアーゼ阻害剤）中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって又はスペーサーを介して結合させることを含む、上記結合体の製造方法；並びに上記結合体を含む医薬。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名 中外製薬株式会社